

**Über die Beeinflussung
der Butyryldehydrogenase-Aktivität
durch synthesesfördernde Hormone
und fettlösliche Vitamine**

Fritz Wolf

1964

Aus dem Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. Johs. Brüggemann

ÜBER DIE BEEINFLUSSUNG DER BUTYRYL-
DEHYDROGENASE-AKTIVITÄT DURCH SYNTHESFÖRDERNDE
HORMONE UND FETTLÖSLICHE VITAMINE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Fritz Wolf

aus Mosbach

München 1964

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. L. KOTTER
Referent: Prof. Dr. Dr. Johs. BRÜGGEMANN

Tag der Promotion: 28. Februar 1964



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
Literatur	3
1. Stellung der Butyryldehydrogenase im intermediären Stoffwechsel	3
2. Die Beeinflussung der Aktivität der Butyryldehydrogenase durch verschiedene Substanzen	6
Experimenteller Teil	8
Tiermaterial	
1. Ratten	8
2. Hühner	10
Methodik	12
1. Herstellung der Organhomogenate	12
2. Bestimmung der Cytochrom c-Oxydation	12
3. Bestimmung der Butyryldehydrogenase	13
Ergebnisse	19
Beeinflussung der Butyryldehydrogenase-Aktivität durch	
1. Insulin (Leber, Herz, Niere der Ratte)	19
2. Östrogene (Uterus der Ratte)	27
3. Vitamin E (Leber, Herz, Niere der Ratte)	34
4. Vitamin A (Hühnerleber)	39
5. Cortison (Leber der Ratte)	41

	Seite
Diskussion	42
Zusammenfassung	47
Literaturverzeichnis	49
Lebenslauf	

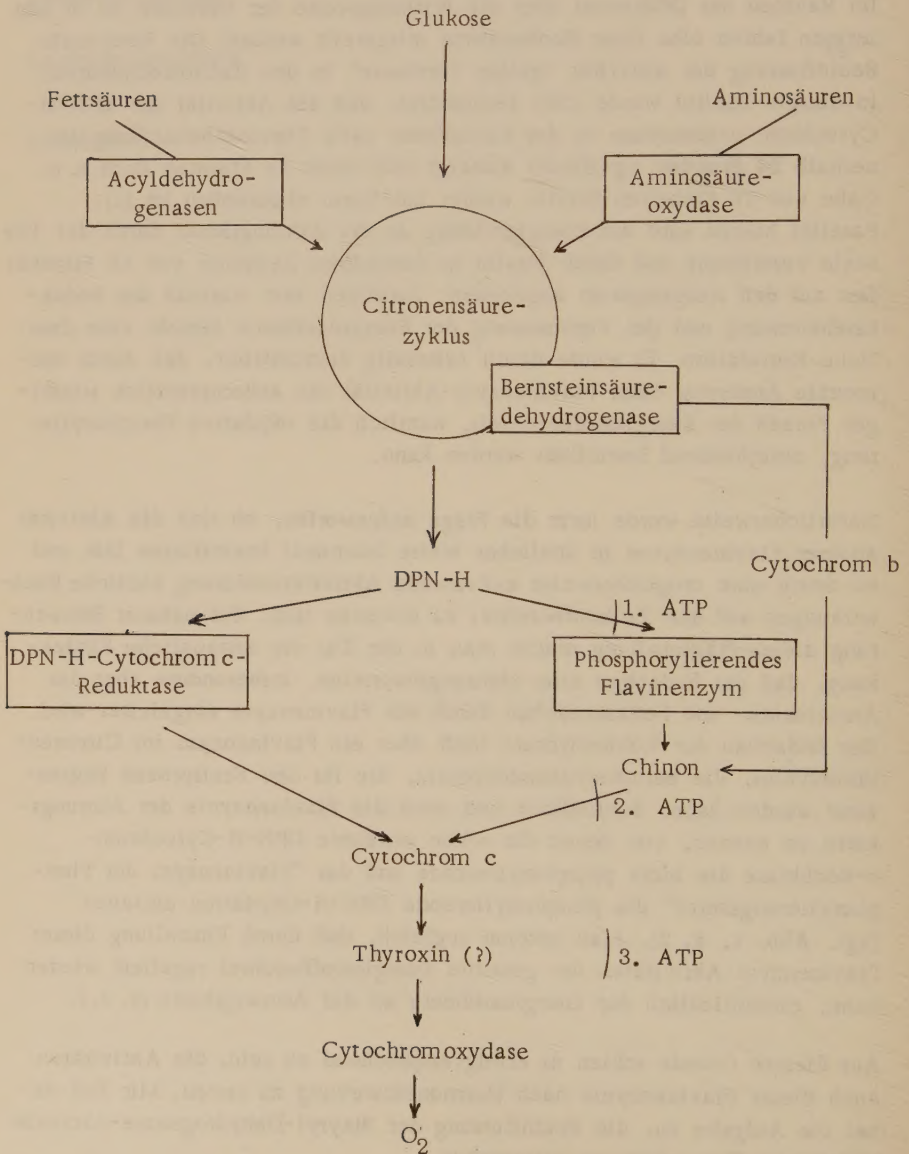
EINLEITUNG

Im Rahmen der Diskussion über die Wirkungsweise der Hormone ist in den letzten Jahren eine neue Beobachtung mitgeteilt worden: Die hormonale Beeinflussung der Aktivität "gelber Fermente" in den Zellmitochondrien. In diesem Institut wurde 1961 beobachtet, daß die Aktivität der DPN-H-Cytochrom c-Reduktase in der Rattenleber nach Thyroxinbehandlung innerhalb 24 Stunden signifikant ansteigt und schon 15 Minuten nach s. c. Gabe von 10 Einheiten Insulin wieder zur Norm abgesunken ist (1). Parallel hierzu wird die Energiebildung an der Atmungskette durch das Thyroxin vermindert und durch Insulin in demselben Zeitraum von 15 Minuten fast auf den Ausgangswert angehoben. Zwischen dem Ausmaß der Reduktasehemmung und der Verbesserung der Energieausbeute besteht eine deutliche Korrelation. Es wurde damit erstmalig demonstriert, daß durch hormonale Änderung einer Flavinenzym-Aktivität ein außerordentlich wichtiger Prozeß des Energiestoffwechsels, nämlich die oxydative Phosphorylierung, entscheidend beeinflußt werden kann.

Natürlicherweise wurde jetzt die Frage aufgeworfen, ob sich die Aktivität anderer Flavinenzyme in ähnlicher Weise hormonal beeinflussen läßt und ob durch eine möglicherweise auftretende Aktivitätsänderung ähnliche Rückwirkungen auf den Zellstoffwechsel zu erwarten sind. Bei näherer Betrachtung dieser Fragestellung macht man in der Tat die erstaunliche Entdeckung, daß der Endabbau aller Nahrungsbausteine, insbesondere aber der Aminosäure- und Fettsäureabbau durch ein Flavinenzym eingeleitet wird. Der Endabbau der Kohlenhydrate läuft über ein Flavinenzym im Citronensäurezyklus, die Bernsteinsäuredehydrase, die für den Kreisprozeß begrenzend werden kann. Schließlich sind noch die Flavinenzyme der Atmungskette zu nennen, von denen die schon erwähnte DPN-H-Cytochrom-c-Reduktase die nicht phosphorylierende und das "Flavinenzym der Phosphorylierungskette" die phosphorylierende DPN-H-Oxydation einleitet (vgl. Abb. 1, S. 2). Man erkennt sogleich, daß durch Einstellung dieser Flavinenzym-Aktivitäten der gesamte Energiestoffwechsel reguliert werden kann, einschließlich der Energieausbeute an der Atmungskette (s. o.).

Aus diesem Grunde schien es erfolgversprechend zu sein, die Aktivitäten auch dieser Flavinenzyme nach Hormoneinwirkung zu testen. Mir fiel dabei die Aufgabe zu, die Beeinflussung der Butyryl-Dehydrogenase-Aktivität (Fettsäurezyklus) näher zu untersuchen.

Abb. 1: Stellung der Flavinenzyme im intermediären Stoffwechsel

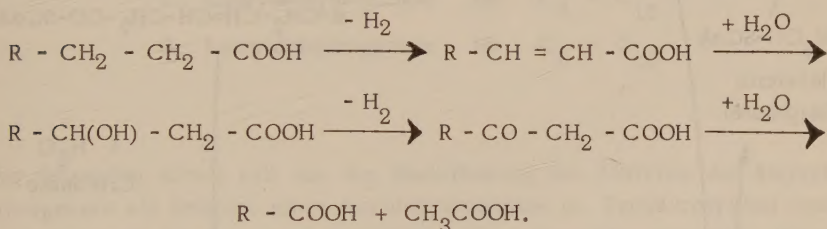


LITERATUR

1. Stellung der Butyryldehydrogenase im intermediären Stoffwechsel

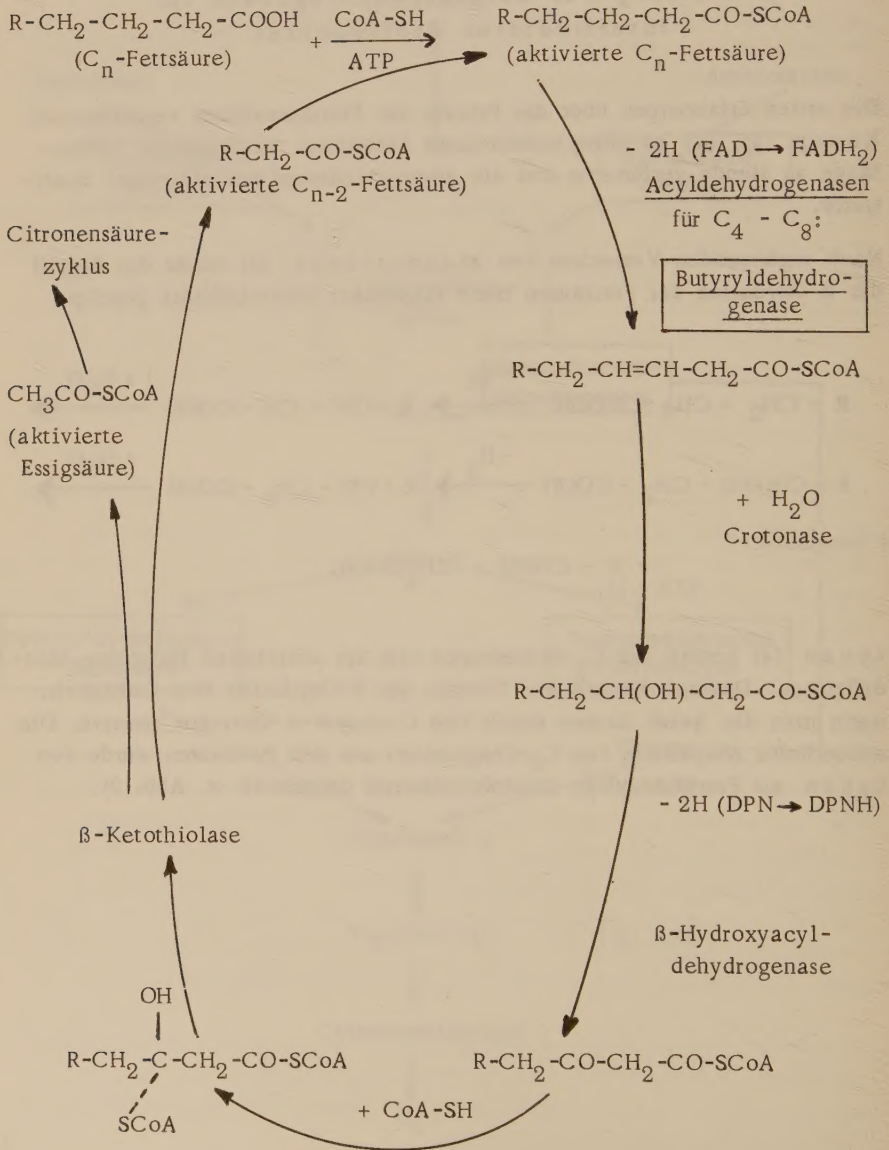
Die ersten Erfahrungen über das Prinzip des Fettsäureabbaus verdanken wir Knoop (2), der ω -phenylsubstituierte Fettsäuren verschiedener Kettenlänge an Hunde verfütterte und die ausgeschiedenen Benzolderivate analysierte.

Nach ergänzenden Versuchen von Magnus-Levy (3) wurde der Begriff der β -Oxydation der Fettsäuren nach folgendem Formelschema geprägt:

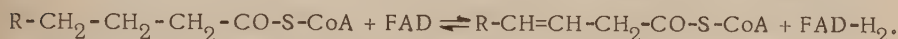


Lynen (4) konnte die C_2 -Bruchstücke mit der aktivierten Essigsäure identifizieren. Dadurch behielt die Theorie der β -Oxydation ihre Gültigkeit, wenn man die freien Säuren durch ihre Coenzym-A-Derivate ersetzte. Die wiederholte Abspaltung von C_2 -Fragmenten aus den Fettsäuren wurde von Lynen als Fettsäurezyklus zusammenfassend dargestellt (s. Abb. 2).

Abb. 2: Fettsäurezyklus nach Lynen (5)



Wie aus dem Schema des Fettsäurezyklus zu ersehen ist, besteht der erste Schritt beim Abbau des Coenzym-A-Derivates einer gesättigten Fettsäure in seiner Dehydrierung durch die Acyldehydrogenasen unter Bildung der α - β -ungesättigten Verbindung. Der dabei freiwerdende Wasserstoff wird nach folgender Gleichung vom Flavinadenindinukleotid (FAD) übernommen:



Die drei bis jetzt isolierten Acyldehydrogenasen werden nach ihrer Spezifität für Fettsäuren verschiedener Kettenlängen benannt (6):

1. Butyryldehydrogenase für C_4 - C_8
2. Capryldehydrogenase für C_4 - C_{16}
3. Lauryldehydrogenase für C_6 - C_{16}

In der folgenden Arbeit soll nun die Beeinflussung der Aktivität der Butyryldehydrogenase als Beispiel einer Acyldehydrogenase (s. Fettsäurezyklus) durch synthesefördernde Hormone und fettlösliche Vitamine näher untersucht werden.

Seubert und Lynen (7) berichten erstmals über die Existenz und Wirkungsweise der Butyryldehydrogenase. Sie konnten dieses Enzym als ein 400fach angereichertes Flavoprotein von rein gelber Farbe aus Schafsleber erhalten.

Green und Mitarbeiter (8) gewannen eine grün gefärbte Dehydrogenase ähnlicher Spezifität aus Ochsenleber.

Von Seubert, Lynen und Mahler (7, 9, 10) wurde FAD als Wirkgruppe der Butyryldehydrogenase erkannt.

Crane und Beinert (11, 12) konnten durch Elektrophorese ein weiteres Flavoprotein abtrennen, das den Elektronenübergang von der Butyryldehydrogenase zum terminalen Atmungssystem katalysiert. Es wurde als "electron transferring flavoprotein" (=ETF) bezeichnet und vermittelt sehr wahrscheinlich den Elektronenübergang von den Acyldehydrogenasen zum Cytochrom c.

2. Die Beeinflussung der Aktivität der Butyryldehydrogenase durch verschiedene Substanzen

Da es sich bei der Butyryldehydrogenase um ein erst in jüngster Zeit entdecktes Ferment handelt, konnten nur wenige Beiträge zu diesem Thema in der Literatur gefunden werden.

Carter und Phizackerley (13) berichten über eine verminderte Oxydation von Buttersäure in Leberschnitten von Pyridoxin-Mangelratten.

Da Pyridoxin nicht an der Buttersäureoxydation beteiligt ist, dürfte es sich hier um einen indirekten Effekt handeln.

Unabhängig davon konnten Tulpule und Patwardhan (14, 15) beobachten, daß Leberhomogenate von Fett- und Pyridoxin-Mangelratten eine verminderte Fähigkeit zeigten, Butyrat zu oxydieren. Ferner bemerkten sie an 4 - 5 Wochen alten Ratten, die eine Fett- bzw. eine Pyridoxin-Mangel-diät erhielten, daß die Butyrat- und Capronat-Dehydrogenase bei Fettmangel signifikant herabgesetzt waren; durch zusätzlichen Pyridoxin-Mangel konnte dieser Effekt nicht verstärkt werden. Pyridoxin-Mangel allein hatte keinerlei Einfluß auf diese Fermente.

Zur Bestimmung der Fermentaktivitäten wurde von den Autoren die Reduktionszeit einer 0,1%igen Methylenblaulösung ausgewertet. Allerdings setzt die Butyryldehydrogenase lediglich das aktivierte Butyrat (Butyryl-CoA) um, so daß die gewählte Versuchsanstellung zur Ermittlung dieser Fermentaktivität nicht ganz spezifisch ist, denn der beobachtete Effekt kann auch auf ATP bzw. Co-Enzym-A-Mangel zurückgeführt werden.

Black und Speer (16) berichten über die Wirkung von Testosteron, Östradiol und Compound A (11-Dehydrocorticosteron) in vitro auf die "Dehydrogenasenaktivität" der Nebennieren von normalen und Mammatumoren tragenden FW-Mäusen.

Zur Bestimmung der Dehydrogenase-Aktivität gingen die Autoren folgendermaßen vor: Die Nebennieren wurden zusammen mit den jeweiligen Hormonen in 1%iger Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung (TTC-Lösung) über 1 Stunde bei 37°C gehalten. Anschließend wurde in den angefertigten Gefrierschnitten der Flächenanteil des gebildeten Formazans ermittelt. Es wurden je Kontroll- und Versuchstest 4 Schnitte angefertigt und ausgewertet.

Mit dieser Methode war bei normalen, männlichen Tieren im Kontrolltest eine starke "Dehydrogenase-Aktivität" in allen drei Nebennierenzonen festzustellen. Eine Testosteronzugabe hatte keinerlei Einfluß; wohl aber ließ sich bei Compound A und bei Östradiolzugabe eine deutliche Hemmung in der Glomeruluszone nachweisen. Im Kontrolltest mit normalen, weiblichen Tieren zeigte sich eine schwache Aktivität in der Glomeruluszone, eine größere in der Zona fascicularis und eine wechselnde in der Zona reticularis. Weder Testosteron noch Östradiol verursachten eine Aktivitätsänderung gegenüber den Kontrollen. Nach Compound-A-Zusatz jedoch konnte in der Glomeruluszone eine deutliche, in der Zona fascicularis eine geringe und in der Zona reticularis gar keine Hemmung festgestellt werden. Bei den Mammatumoren tragenden Tieren war im Kontrolltest die Aktivität aller drei Zonen sehr hoch. Testosteron-, Östradiol- und Compound-A-Zugaben verursachten in der Glomeruluszone eine deutliche, in der Zona fascicularis eine leichte und in der Zona reticularis gar keine Hemmung.

Früher hatten dieselben Autoren gefunden, daß bei normalen Tieren die "Dehydrogenase-Aktivität" durch Desoxycorticosteronacetat-Zusatz (DOCA) gehemmt, durch Cortison und Compound F (17-Hydrocorticosteron) jedoch stimuliert worden war. Bei Mammatumoren tragenden Tieren hatten sie aber eine Hemmung durch Glukocortikoide festgestellt, während durch DOCA kein Einfluß oder eine Stimulierung registriert wurde. In der Zona fascicularis und reticularis konnten hierbei keine deutlichen Effekte erzielt werden.

Über eine spezifische hormonale Beeinflussung der hier zur Diskussion stehenden Butyryldehydrogenase sagen diese Befunde naturgemäß nichts aus, da nur die "Gesamt-Dehydrogenase-Aktivität" - ohne Zusatz eines bestimmten Substrates - erfaßt wurde. Außerdem erscheint es verwunderlich, daß die ACTH-Wirkung nicht überprüft wurde; denn gerade dieses Hormon dürfte die Dehydrogenasen der Nebennieren spezifisch beeinflussen.

Insgesamt läßt sich aus dieser kurzen Literaturzusammenstellung entnehmen, daß über die Beeinflussung der Butyryldehydrogenase-Aktivität durch Hormone und fettlösliche Vitamine bisher überhaupt keine Angaben vorliegen. Die folgende Arbeit soll daher dieser Problematik gewidmet sein.

EXPERIMENTELLER TEIL

TIERMATERIAL

Die einzelnen Versuchsreihen wurden mit folgenden Tieren durchgeführt:

1. Ratten

Es handelte sich um Sprague-Dawley-Ratten, die z. T. aus der Zucht des Institutes für Physiologie und Ernährung der Tiere stammten.

a) Tiere der Auswahl A:

Diese Tiere erhielten "Altromin"-Preßfutter folgender Zusammensetzung (Fa. Altrogge, Lage/Lippe):

48% Gerste

18% Hafer

12% Mais

17% Eiweißkonzentrat

bestehend aus: 40% Fischvollmehl (65% Rohprotein)
37% Tierkörpermehl (65% Rohprotein)
16% Waldhof-Trockenfutterhefe
4% Futterknochenschrot (unentleimt)

4% Luzernegrünmehl

1% Dicalciumphosphat (mit Vitaminen und Spurenelementen)

Gehalt an Spurenelementen/kg der fertigen, obigen
Mischung:

Magnesium 370 mg

Kupfer 33 mg

Mangan 10 mg

Zink 10 mg

Kobalt 0,05 mg

Wirkstoffgehalt an Vitaminen:

Vitamin A 10 000 IE/kg Fertigfutter

Vitamin D 1 000 IE/kg "

Vitamin E 25 mg/kg "

b) Tiere der Auswahl B:

Diese Tiere erhielten ein Schrotfutter - hier als "Zuchtfutter grün" bezeichnet - folgender Zusammensetzung (in %):

45 Weizenschrot	Zusammensetzung der Mineralstoff-
30 Maisschrot	mischung:
15 Sojaschrot	40 % kohlensaurer Futterkalk
3 Magermilchpulver	30 % phosphorsaurer Futterkalk
2 Luzernegrünmehl	24,5 % Viehsalz
2 Mineralstoffmischung	5,0 % Mg-Sulfat
	0,5 % Spurenelemente als Sulfate
	(Fe:Cu:Mn:Co = 5:1,5:1,0:0,2)

c) Tiere der Auswahl C: (Vitamin-E-Mangeldiät)

Weibliche Tiere, die 6 Monate mit einer Vitamin-E-Mangeldiät gefüttert worden waren, wurden freundlicherweise vom Vitamin-E-Labor des Institutes (Fräulein Dr. Zentz und Herr Dr. Nieser) zur Verfügung gestellt.

Die Vitamin-E-Mangeldiät war folgendermaßen zusammengesetzt:

Casein	20 %	über Casein wurden folgende
Rohrzucker	56 %	Vitamine zugeführt:
Bierhefe,		Vitamin A 5600 IE/kg } der fertigen
(Futterhefe, nicht		Vitamin D ₃ 800 IE/kg } Mischung
gärfähig)	10 %	Mineralsalzmischung:
Olivöl DAB 6	10 %	NaCl 3,7 %
Mineralsalz-		MgSO ₄ + 7 H ₂ O 5,7 %
Mischung	4 %	NaH ₂ PO ₄ + 2 H ₂ O 7,4 %
		K ₂ HPO ₄ 20,4 %
		Ca (H ₂ PO ₄) ₂ + 2 H ₂ O 11,1 %
		Ca-Laktat 23,8 %
		Fe-Laktat 27,9 %

Als Maß für den Mangelzustand der Versuchstiere wurde der Hämolysetest nach Friedmann (17) durchgeführt. Dieser Test war bei allen Tieren, die unter Vitamin-E-Mangel standen, 100%ig positiv. Der Hämolysetest wurde von Fräulein Dr. Zentz durchgeführt, der hierfür besonders gedankt sei.

d) Kastrierte weibliche Tiere:

Die kastrierten weiblichen Tiere erhielten vor und nach der Kastration "Zuchtfutter grün".

Die Kastration wurde in Äthernarkose folgendermaßen durchgeführt: Nach Vorbereitung des Operationsfeldes im Bereich der Lendenwirbel wurde ein etwa 2,5 cm langer medianer Hautschnitt angelegt. Durch seitliches Verschieben der Hautwunde wurde die Bauchhöhle am Rande der Lendenwirbelquerfortsätze von dorsolateral unter teilweise stumpfer Durchtrennung der Muskulatur eröffnet. Mit einer Hakenpinzette wurden das Ovar und ein Teil des Uterus eventriert und anschließend das Ovar nach einer Seidenligatur vom Eileiter abgesetzt. Die Hautwunde wurde nach Auftragen von antibiotischem Puder mit einer Knopfnahnt geschlossen. Die Tiere zeigten nach der Operation keinerlei Störung des Allgemeinbefindens; die Heilung erfolgte meist per primam.

2. Hühner

Die Versuchshühner wurden in Zusammenarbeit mit dem Vitamin-A-Labor des Institutes von Herrn Dr. Tiews freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um Nichols-Lohmann-Broiler. Die Tiere erhielten zum Teil eine Vitamin-A-Mangeldiät (Gruppe 1), zum anderen Teil dieselbe Mangeldiät + Vitamin-A-Zusatz.

Das Grundfutter hatte folgende Zusammensetzung:

25,0 % Casein	2,0 % Cellulose
13,0 % Gelatine	37,0 % Glukose
15,0 % Sojaöl	6,0 % Mineralsalzmischung ¹⁾
	2,0 % Vitaminvormischung

Dem Futter der Gruppe 2 wurden jeweils 10 000 IE Vitamin A pro kg Fertigfutter zugegeben.

1) Nach WESSON, L.G.: Science N.Y. 75, 339 (1932)

Vitaminvormischung:	Vitamin D ₃	10 000 IE/kg	} der fertigen Mischung
	E	50 mg/kg	
	K ₃	2 "	
	B ₁	25 "	
	B ₂	15 "	
	B ₆	8 "	
	Nikotinsäure	100 "	
	Ca-Pantothenat	20 "	
	Vitamin B ₁₂	30 "	
	Folsäure	4 "	
	Biotin	300 "	
	Ascorbinsäure	25 "	
	Aureomycin	5 "	
	Penicillin	10 "	
	Cholinchlorid	2 g/kg	
	Methionin	6 "	

METHODIK

1. Herstellung der Organhomogenate

Die Tiere wurden durch Dekapitation getötet. Anschließend wurden die einzelnen Organe eingewogen und sofort in eiskalter isotonischer Rohrzuckerlösung (17 g Rohrzucker/200 ml H₂O) im Homogenisator zerkleinert.

Die Mengenverhältnisse Organ zu Lösungsmittel waren bei den einzelnen Organen etwa folgende:

bei Leber	600 mg +	10 ml Rohrzuckerlösung	
" Herz	400 - 600 mg +	4 - 6 ml	"
" Niere	600 mg +	5 ml	"
" Uterus	120 - 160 mg +	ca. 3,5 ml	"

Das erhaltene Homogenat wurde 2mal bei 3000 Upm zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit dekantiert. Das Homogenat wurde bis zu Beginn des Testes bei 0°C gehalten.

2. Bestimmung der Cytochrom c-Oxydation

Zur Bestimmung der Cytochrom c-Oxydation wurde 1 ml des fertigen Homogenates mit Rohrzuckerlösung ad 10 ml verdünnt und davon 0,1 ml zum Test verwendet. Die Zeiträume zwischen der Gewebeentnahme, dem Homogenisieren und der Messung wurden konstant gehalten. Die Messung erfolgte im Eppendorf-Photometer bei 546 nm, d = 1 cm und 18°C.

Die Küvette enthielt:

- 2,3 ml Trispuffer, pH 7,4
- 0,2 ml Na-Dithionitlösung
- 0,5 ml Cytochrom c-Lösung (2×10^{-4} m) "Boehringer"
- 0,1 ml Homogenat (verdünnt).

Die Konzentration der Dithionitlösung mußte variiert werden, da sich das Verhältnis von oxydiertem zu reduziertem Cytochrom c bei den Boehringer-Präparaten als nicht konstant erwies. In jedem Fall wurden nur etwa 75% des Cytochroms reduziert, um einen Dithionitüberschuß zu vermeiden.

Es wurde je 4mal die Zeit für eine Extinktionsänderung von $\Delta E = 0,025$

gemessen. Die Berechnung erfolgte aus der Anfangsgeschwindigkeit, bezogen auf Protein (Eiweißbestimmung nach Kjeldahl $N \times 6,25$).

3. Bestimmung der Butyryldehydrogenase

Zur Bestimmung der Butyryldehydrogenase sind verschiedene Verfahren bekannt:

- a) Tulpule und Patwardhan (15) benutzten als Test die Entfärbungszeit einer 0,1%igen Methylenblaulösung.
- b) Rindani verwendete die Methode nach Schneider und Potter. In diesem Fall wurde das Homogenat zusammen mit dem Substrat in Warburgkölbchen inkubiert und der O_2 -Verbrauch über 1 Std. verfolgt.
- c) Die Grundlagen zur Dehydrogenase-Bestimmung unter Verwendung von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) schuf Richard Kuhn (19) 1941 durch die Entdeckung, daß diese Verbindung durch Flavinenzyme leicht zu rotem Triphenylformazan reduziert wird.

Der hier angewandte Test zur Bestimmung der Butyryldehydrogenase mit TTC wurde von Henry R. Mahler (20) ausgearbeitet.

Als Substrat wurde nicht Butyryl-CoA, sondern Butyrylcysteamin (Modellsubstanz nach Lynen) verwendet (9).

Prinzip des Testes:

TTC läßt sich leicht unter Addition von 2H-Atomen in rotgefärbtes Triphenylformazan überführen.

Die Menge des gebildeten Formazans wird kolorimetrisch bestimmt. Dementsprechend dient als Maß für die Dehydrogenase-Aktivität die von 1 mg Eiweiß des Homogenates reduzierte Menge TTC (Angabe in n-Mol TTC¹⁾, reduziert durch 1 mg Homogenateiweiß in 1 Stunde).

Die Eichkurve für TTC ist in Abb. 3 dargestellt.

1) n Mol = nano Mol = 10^{-9} Mol

Darstellung des Butyrylcysteamins:

1. Darstellung des N-Acetylcysteamins

83 g Thioessigsäure wurden in 75 ml absol. Äthanol gelöst und unter Kühlung ($+5^{\circ}$ bis -10°C) mit 48 g Äthylenimin tropfenweise versetzt. Anschließend wurde das Gemisch 30 Minuten am Rückfluß gekocht, das Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand im Vakuum destilliert. Die N-Acetylverbindung geht als farbloses Öl bei $138 - 140^{\circ}\text{C}$ (7 Torr) über. Die Ausbeute betrug 45 g.

2. Das Bleisalz des N-Acetylcysteamins

23 g N-Acetylcysteamin wurden in 40 ml Aqua dest. gelöst und unter Rühren eine Lösung von 40 g Bleiacetat $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (in 300 ml Wasser) zugegeben.

Das Bleisalz fällt als orangefarbener Niederschlag aus; es wurde abzentrifugiert, 2mal mit 300 ml Aqua dest., 2mal mit Alkohol (96%) und schließlich mit Äther gewaschen.

Nach dem Trocknen im Exsikkator wurde ein gelbes Pulver erhalten. Die Ausbeute betrug 26 g.

3. Darstellung von N-Butyrylchlorid

10,0 g Buttersäure, gelöst in 100 ml tiefsiedendem Petroläther, wurden unter Ausschluß von Feuchtigkeit mit 18,5 g Thionylchlorid versetzt und 4 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt. Nach dem Verjagen des Petroläthers wurde das Butyrylchlorid destilliert, das bei 78°C farblos überging. Die Ausbeute betrug 10 g.

4. Darstellung des S-Butyryl-N-Acetyl-Cysteamins

10 g Butyrylchlorid wurden in 150 g absolutem, peroxydfreiem Tetrahydrofuran (THF) gelöst und 25 g des feingepulverten, trockenen Bleisalzes zugefügt.

Die Suspension wurde 2 - 3 Stunden auf dem Wasserbad ($40 - 50^{\circ}\text{C}$) unter Ausschluß von Feuchtigkeit erwärmt.

Der Verlauf der Reaktion läßt sich am Verschwinden der gelben Farbe des Bleicysteamins verfolgen, das in weißes Bleichlorid übergeht. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Bleichlorid abgesaugt und 2mal mit THF

gewaschen. Anschließend wurde das THF abdestilliert.

Die Destillation des zurückbleibenden gelben Öls erfolgte im Ölpumpen-vakuum bei 0,1 Torr.

Das Butyrylcysteamin wurde als farbloses Öl erhalten.
(Schmelzpunkt 10 - 20°C).

Mit dem so dargestellten Substrat wurde die Bestimmung folgendermaßen durchgeführt:

In 10 ml Zentrifugengläser wurden pipettiert:

0,04 ml Methylenblaulösung 0,2%ig

0,12 ml TTC-Lösung 1,0%ig

0,16 ml Trispuffer (Trishydroxymethylaminomethan 0,05 m mit
0,1 n HCl eingestellt auf pH 8,2)

0,1 ml Butyrylcysteamin 0,01 m

bzw. Aqua dest. für den Blindwertansatz

0,1 ml Organhomogenat.

In das Reaktionsgemisch wurde genau 1 Minute lang Stickstoff eingeleitet, der durch einen Cu-Turm von Sauerstoffspuren befreit war. Danach wurde das Zentrifugenglas sofort mit einem Gummistopfen verschlossen und 1 Stunde bei 38°C im Wasserbad gehalten.

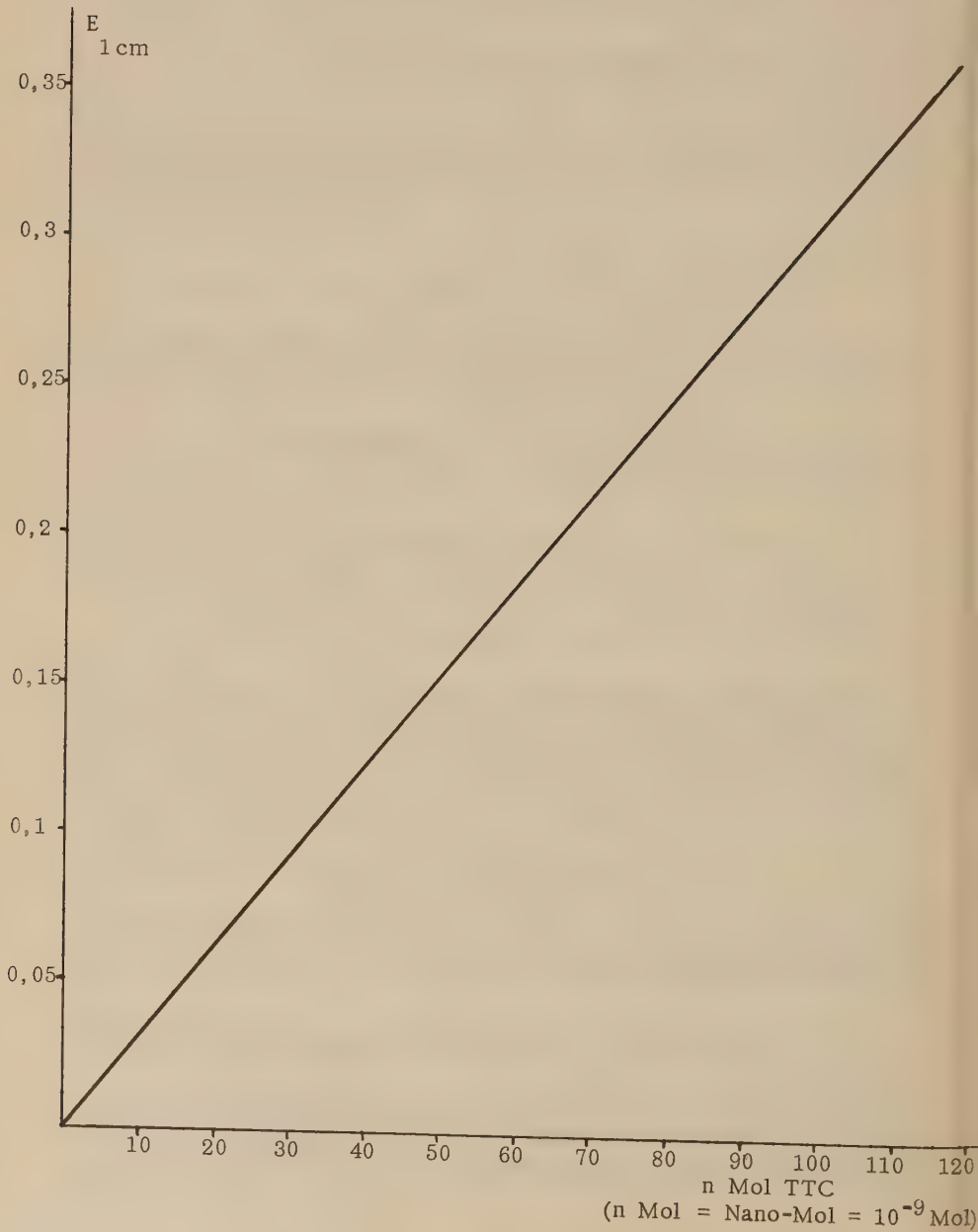
Nach Unterbrechen der Reaktion mit 1 Tropfen 1 n HCl wurde das entstandene Triphenylformazan durch Zugabe von 1,5 ml Aceton und 4,5 ml Tetrachlorkohlenstoff unter kräftigem Schütteln extrahiert. Nach dem Zentrifugieren wurde die überstehende wässrige Schicht abgesaugt. Das in Aceton und Tetrachlorkohlenstoff gelöste rote Formazan wurde in 1 cm- (bzw. bei sehr geringer Formazanbildung in 2 cm-) Küvetten im Eppendorf-Photometer bei Filter 492 nm gegen H₂O gemessen.

Parallel wurde jeweils die Blindreduktion bestimmt; in diesem Fall wurde das Substrat (= Butyrylcysteamin) durch die gleiche Menge Aqua dest. ersetzt.

Sowohl für die Blindwerte als auch für die Hauptwerte wurden mindestens 3 Parallelmessungen durchgeführt.

Die durch die Butyryldehydrogenase reduzierte Menge TTC ergab sich aus der Differenz der Extinktionswerte von Blindwert und Hauptwert:

Abb. 3: Eichkurve für Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)



$$\text{Mol TTC reduziert / 1 mg Protein} = \frac{\text{Mol TTC (aus der Eichkurve)}}{\text{mg Kjeldahlprotein} \times 0,1}$$

Die Schwankungsbreite des Verfahrens beträgt ca. $\pm 16\%$.

Statistische Auswertung:

Die statistische Auswertung der ermittelten Einzelwerte wurde nach folgenden Formeln vorgenommen:

Mittlerer Fehler des Einzelwertes:
(quadratische Abweichung)

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum \Delta^2}{n - 1}}$$

$\sum \Delta^2$ = Summe der quadrierten Differenzen zum Mittelwert

n = Anzahl der Differenzen

n - 1 = Freiheitsgrade

Streuung der Differenz im Paarvergleich:

$$s_d = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2 - (d^- \cdot \sum d)}{n (n - 1)}}$$

s_d = Streuung der Differenz

d = einzelne Differenz

$\sum d^2$ = Summe der quadrierten Differenzen

d^- = Mittelwert der einzelnen Differenzen

n = Anzahl der Differenzen

$\sum d$ = Summe der Differenzen

t - Test:

$$t = \frac{d^-}{s_d}$$

Mit Hilfe des t -Wertes wird in der Tabelle die Grenzwahrscheinlichkeit (p -Wert) entsprechend den Freiheitsgraden ($\text{Freiheitsgrade} = n - 1$) abgelesen.

ERGEBNISSE

I. Die Beeinflussung der Aktivität der Butyryl-Dehydrogenase-Aktivität durch Insulin

Für die erste Versuchsreihe wurden männliche Ratten der Auswahl A ("Altromin", gleiche Wachstumsintensität) herangezogen. Die Tiere kamen - über Nacht ausgenüchtert - zum Versuch und erhielten 10 Einheiten Insulin "Hoechst" bzw. eine entsprechende Menge Insulin "Novo" ¹⁾. Den Kontrollen wurde das gleiche Volumen einer physiologischen NaCl-Lösung injiziert. Die Tötung erfolgte nach verschiedenen Zeiten.

Wie aus der Tabelle 1 Seite 22 und der zugehörigen Abb. 5 Seite 23 zu ersehen ist, zeigten die Tiere nach einstündiger Einwirkung des Insulins eine deutliche Hemmung der Butyryl-Dehydrogenase in der Leber. In der Niere war der Effekt wesentlich geringer und im Herzmuskel war keine Hemmung nachzuweisen.

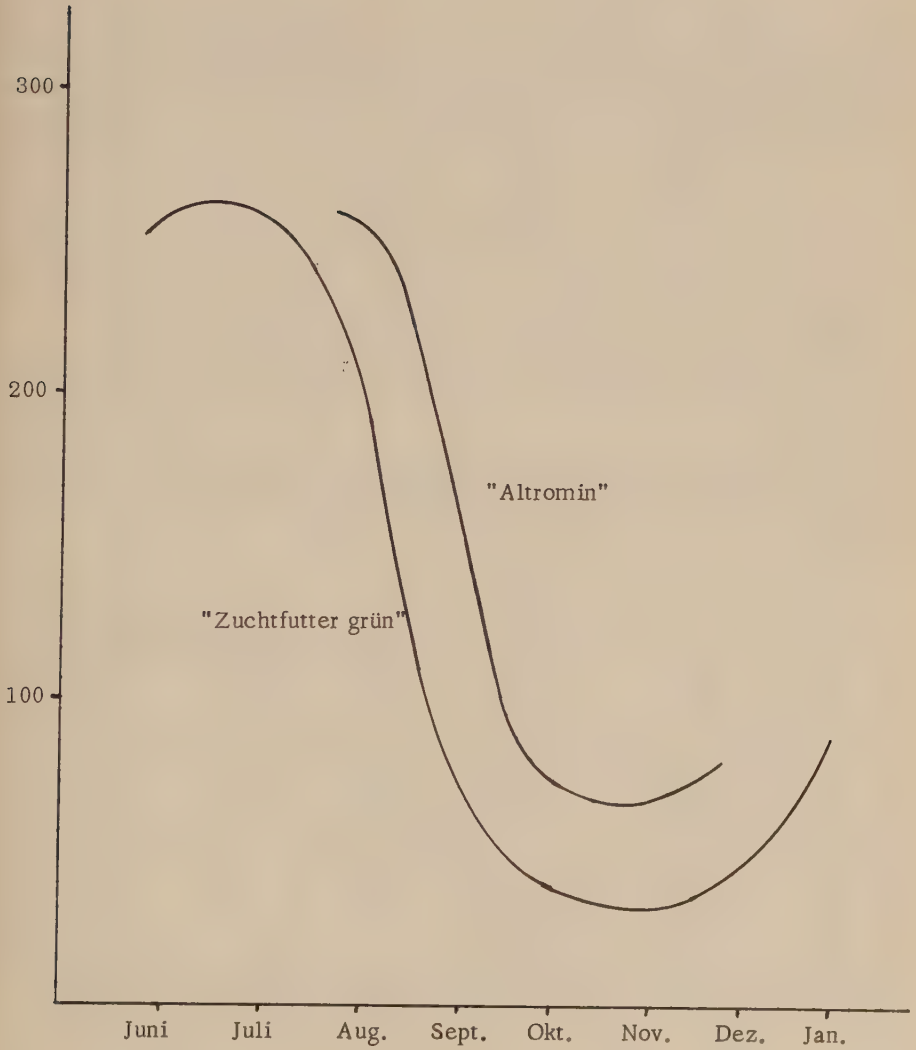
Parallel zu diesen Messungen wurde aus denselben Homogenaten die Geschwindigkeit der Cytochrom c-Oxydation bestimmt, die nach Schöle (21) als angenähertes Maß für die Schilddrüsenfunktion angesehen werden kann. Die erhaltenen Werte sind ebenfalls in der Tabelle 1 Seite 22 angegeben. Man erkennt anhand der Datum-Angabe, daß die Cytochrom c-Oxydation bei dem ausgesuchten Tiermaterial im Verlaufe des Monats September von 300 n Mol TTC (6.9.) auf 85 n Mol (13.10.) abfällt. Wir haben die Cytochrom c-Oxydation in gleicher Weise über das ganze Jahr verfolgt und ein charakteristisches Maximum im Sommer und ein ebenso charakteristisches Minimum im Winter gefunden (s. Abb. 4 Seite 21). Diese jahreszeitlichen Schwankungen der Schilddrüsenfunktion sind schon seit längerer Zeit bekannt und lassen sich, wie man sieht, anhand der Geschwindigkeit der Cytochrom c-Oxydation reproduzieren. Dieser Be-

1) Den Farbwerken "Hoechst" und der Firma "Novo", Therapeutisk Laboratorium Kopenhagen wird für die Bereitstellung der Insulinpräparate besonders gedankt.

fund spricht ebenfalls dafür, daß die Höhe des Thyroxinspiegels annähernd mit diesem Test erfaßt wird.

Weiterhin fällt bei näherer Betrachtung der Tabelle auf, daß eine Korrelation zwischen der Geschwindigkeit der Cytochrom c-Oxydation und dem Ausmaß des Insulin-Effektes besteht; Kleine Geschwindigkeiten der Cytochrom c-Oxydation (niedriger Thyroxinspiegel) sind mit einem geringen Insulin-Effekt gekoppelt (geringe Hemmung der Butyryl-Dehydrogenase) und umgekehrt. Um herauszufinden, ob dieser Beobachtung allgemeine Gültigkeit zukommt, haben wir alle Versuche, in deren Verlauf die Cytochrom c-Oxydation und die prozentuale Hemmung der Butyryl-Dehydrogenase (10 Einheiten Insulin, Tötung nach 1 Stunde) verfolgt worden waren, anhand der Cytochrom c-Oxydation gruppenweise zusammengefaßt. Hierbei bilden alle Tiere mit einer Cytochrom c-Oxydation zwischen 50 und 75 n Mol TTC die erste Gruppe, zwischen 75 und 100 n Mol die zweite usw. (Tab. 2 Seite 24). Die individuellen Schwankungen sind sehr groß und die Tierzahlen relativ klein. Dennoch sieht man eine deutliche Abhängigkeit, wenn die Meßwerte der einzelnen Gruppen gemittelt werden. Trägt man die Mittelwerte in ein Koordinatensystem ein, so erhält man eine lineare Abhängigkeit zwischen der Schilddrüsenfunktion und der hemmenden Wirkung des Insulins (Abb. 4 Seite 23). Dieses Ergebnis entspricht der schon länger bekannten Erfahrung, daß das Thyroxin die Insulinwirkung verstärkt.

Abb. 4: Änderung der Geschwindigkeit der Cytochrom c-Oxydation in Abhängigkeit von der Jahreszeit



Ordinate:
n Mol TTC/mg Protein/Stunde

TABELLE 1: Die Insulinwirkung auf die Butyryldehydrogenase-Aktivität
(Tiere der Auswahl A, "Altromin", 10 I.E. Insulin)
Angaben in n Mol TTC reduziert / mg Protein / Stunde

Kontroll- Tiere	Cytochrom c- Oxydation	Aktivität der Butyryldehydrogenase in			Datum
		Leber	Herz	Niere	
	280,0	17,2	42,0	32,7	5. 9.
	178,5	28,7	43,0	22,5	9. 9.
	227,5	17,1	40,0	25,2	9. 9.
	220,8	19,1	29,0	22,1	12. 9.
Mittelw. d. Kontr.	226,7	21,0 ± 5,6	38,5 ± 6,4	25,6 ± 4,9	
Insulin- behandelt					
Tötung nach Minuten					
15	--	29,0	--	--	5. 9.
15	210,0	29,2	47,6	27,3	8. 9.
20	258,3	15,0	20,0	21,4	13. 9.
20	86,7	16,9	28,0	24,0	16. 9.
30	255,5	11,9	21,0	17,5	7. 9.
30	100,0	13,0	22,5	16,1	14. 9.
60	300,0	u.d.N. ¹⁾	23,0	8,5	6. 9.
60	118,2	9,5	28,3	13,8	15. 9.
60	73,0	12,9	--	--	13.10.
60	94,0	12,2	--	--	13.10.

1) u.d.N. = unter der Nachweisgrenze

Abb. 5: Aktivität der Butyryldehydrogenase in der Leber nach Insulingabe (Tiere der Auswahl A; Tab. 1, Seite 22)

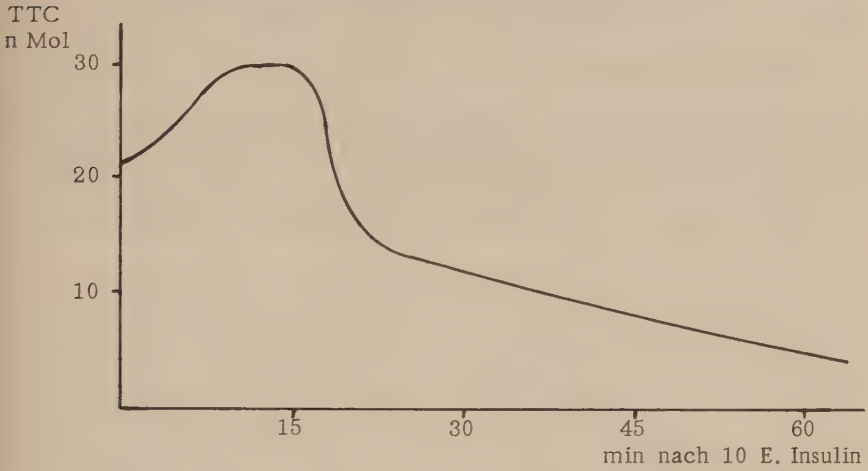


Abb. 6: Die Insulinwirkung auf die Aktivität der Butyryldehydrogenase in der Rattenleber in Abhängigkeit vom Thyroxinspiegel (Tiere der Auswahl A; Tab. 2, Seite 24)

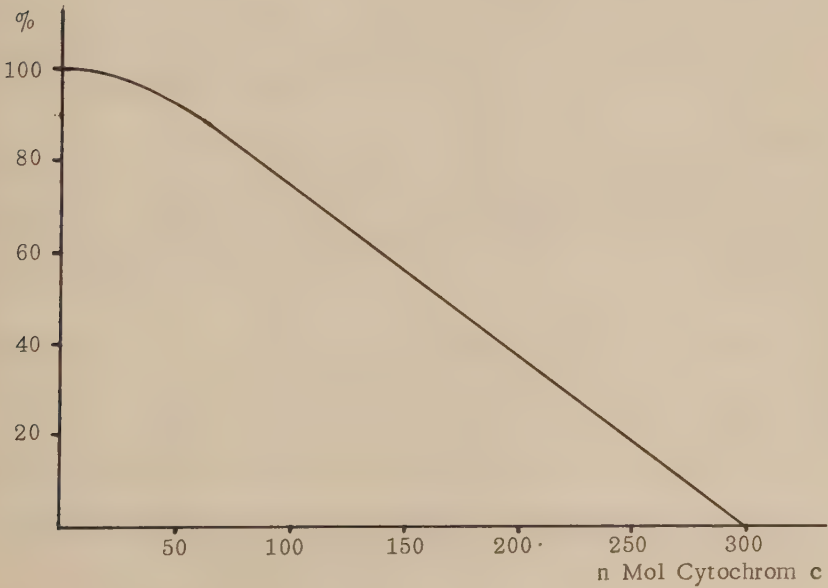


TABELLE 2: Cytochrom c-Oxydation und Aktivität der Butyryl-Dehydrogenase in der Leber unter Einwirkung von 10 Einheiten Insulin s.c. über 1 Stunde

Cytochrom c-Oxydation n Mol Cytochrom c / mg Protein / 120 Sekunden	Aktivität der Butyryl-Dehydrogenase n Mol TTC / mg Protein pro Stunde	Mittelwert ¹⁾ der Gruppe 26,9	$\hat{=}$	% der Kontr. 100%
bis 75,0 56,0 63,0 64,5 65,0 73,0 $\emptyset = 64,3$	26,8 27,8 29,7 23,6 12,9 $\emptyset = 24,2$	24,2	$\hat{=}$	89,8
75,0 bis 100,0 91,0 94,0 94,5 $\emptyset = 87,8$	27,2 13,1 20,4 20,0 16,3 12,2 35,8 $\emptyset = 20,7$	20,7	$\hat{=}$	76,8
100,0 bis 120,0 101,0 114,5 117,5 118,0 $\emptyset = 112,7$	24,8 15,6 26,0 9,5 $\emptyset = 19,0$	19,0	$\hat{=}$	70,4
120,0 bis 150,0 136,0 153,0 $\emptyset = 144,5$	10,8 19,7 $\emptyset = 15,3$	15,3	$\hat{=}$	56,7
über 150,0 300,0	u.d.N.	u.d.N.	$\hat{=}$	0

1) Der Mittelwert für die Kontrollgruppe wurde aus 43 Tieren ermittelt; er beträgt 26,9 n Mol TTC reduziert/mg Protein/Stunde.

In einer zweiten Versuchsreihe sollte überprüft werden, ob nach Verfütterung von "Zuchtfutter grün" ebenfalls eine Hemmung der Aktivität der Butyryl-Dehydrogenase durch Insulin nachgewiesen werden kann. Um die Fermentaktivität zu erhöhen (vgl. Lit. (14, 15) S. 7), wurde das Zuchtfutter noch zusätzlich mit 5 bzw. 10% Fett (Rindertalg) angereichert.

Rattenmännchen gleicher Wachstumsintensität erhielten dieses Futter über 14 Tage, wurden über Nacht ausgenüchtert und mit 10 E Insulin bzw. mit der entsprechenden Menge physiol. NaCl-Lösung behandelt. Nach verschiedenen Zeiten wurde die Fermentaktivität in Leber, Herz und Niere bestimmt.

Wie aus den in der Tabelle 3 Seite 27 zusammengefaßten Meßwerten hervorgeht, ist unter diesen Bedingungen innerhalb 60 Minuten nach der s. c. Insulingabe keine Aktivitätsminderung nachzuweisen. Allerdings muß betont werden, daß die für die Cytochrom **c**-Oxydation ermittelten Daten sehr viel tiefer liegen als bei den "Altromin"-Tieren. Das dürfte z. T. durch die etwas spätere Jahreszeit (Ende September bis Anfang Oktober), im wesentlichen aber durch die unterschiedliche Fütterung bedingt sein. Aus Kontrollversuchen läßt sich entnehmen, daß praktisch ausschließlich der höhere Gehalt des "Altromins" an fettlöslichen Vitaminen (10 000 E Vitamin A und 25 mg Vitamin E/kg Fertigfutter) für die höhere Schilddrüsenfunktion dieser Tiere verantwortlich zu machen ist. Wird das "Zuchtfutter grün" entsprechend mit diesen Vitaminen angereichert, so findet man bei den hiermit gefütterten Tieren eine Cytochrom **c**-Oxydation, die derjenigen der "Altromin"-Tiere entspricht (22).

Nach der Abb. 6 (Seite 23) ist bei einer Geschwindigkeit der Cytochrom **c**-Oxydation unter 60 n Mol Cytochrom **c** innerhalb 60 Minuten kein Insulin-Effekt auf die Aktivität der Butyryl-Dehydrogenase zu erwarten, so daß sich die in dieser Versuchsreihe erhobenen Befunde organisch in das bisher gewonnene Bild einordnen.

TABELLE 3: Die Insulinwirkung auf die Butyryldehydrogenase-Aktivität (Tiere der Auswahl B, "Zuchtfutter grün", mit Fettzusatz; 10 Einheiten Insulin s.c., Angabe in n Mol TTC reduziert/mg Protein/Stunde)

Behandlung	Cytochrom c-Oxydation	Aktivität der Butyryldehydrogenase in			Datum
		Leber	Herz	Niere	
Kontroll-	--	15,8	35,7	21,8	20. 9.
Tier, 5%Fett	--	22,0	29,8	51,4	21. 9.
5% Fett					
10 E Insulin					
Tötung nach					
Minuten					
20	65,0	26,4	18,2	14,9	19. 9.
20	--	20,1	18,5	20,1	20. 9.
30	--	42,5	48,0	24,5	21. 9.
30	30,3	27,8	46,4	27,6	22. 9.
30	16,0	22,2	30,1	29,6	23. 9.
60	106,0	21,2	39,5	35,0	3.10.
60	66,3	22,6	35,0	31,0	3.10.
10% Fett					
10 E Insulin					
Tötung nach					
Minuten					
30	91,5	26,8	37,2	25,2	5.10.
30	84,0	35,8	44,7	22,1	5.10.
60	19,3	35,2	44,0	34,8	26. 9.
60	39,2	36,3	62,5	27,7	27. 9.
60	88,0	38,8	49,5	29,6	28. 9.
60	72,0	37,4	51,5	23,2	4.10.
60	75,4	38,1	56,5	26,2	4.10.
		$\bar{\varnothing} = 37,2$	$\bar{\varnothing} = 52,8$	$\bar{\varnothing} = 28,3$	
		$\pm 1,4$	$\pm 7,0$	$\pm 4,3$	

II. Die Beeinflussung der Butyryl-Dehydrogenase-Aktivität durch Östrogene

Unsere erste Versuchsreihe hatte ergeben, daß durch Insulin bei einer maximalen Einwirkungszeit von 60 Minuten spezifisch die Butyryl-Dehydrogenase der Leber gehemmt wird, während in der Niere nur eine geringe, im Herzmuskel aber überhaupt keine Aktivitätsänderung nachgewiesen werden konnte. Dieses Ergebnis spricht für die - von anderer Seite immer wieder bestrittene - Annahme einiger Autoren, daß das Inselhormon spezifisch auf die Leber wirkt und erst sekundär auf die Muskulatur (23).

Das Insulin ist ein "anaboles" Hormon und fördert daher alle zellulären Synthesen, insbesondere in der Leberzelle. Wenn nun die Vorstellung richtig ist, daß die Flavinenzym-Hemmung eng verknüpft mit dem anabolen Effekt auftritt bzw. denselben sogar einleitet, so müßte man für andere synthesesfördernde Hormone in dem von ihnen spezifisch beeinflussten Gewebe eine ähnliche Wirkung erwarten können. Wir haben daher in gleicher Weise die Östrogen-Wirkung auf den Uterus weiblicher Ratten der Auswahl A ("Altromin") untersucht.

Die Tiere der ersten Versuchsreihe waren nicht kastriert, das Durchschnittsgewicht betrug 220 g. Sie erhielten 100 mcg Östradiol-Benzoeat in öligem Lösung (Olivenöl DAB 6) s.c. injiziert und wurden 3 Stunden später getötet. Der gesamte Uterus wurde herauspräpariert, gewogen, homogenisiert und anschließend die Fermentaktivität bestimmt.

Aus den in der Tabelle 4 Seite 29 zusammengefaßten Meßwerten ist zu ersehen, daß bei diesen Tieren unter den gewählten Bedingungen keine Hemmung der Butyryl-Dehydrogenase zu erwarten ist. Die Versuchswerte sind im Gegenteil durchschnittlich um über 100% angestiegen. Allerdings ist die Streubreite außerordentlich groß. Auch die Uterusgewichte sind - im wesentlichen wohl durch Flüssigkeitseinlagerung - deutlich erhöht.

Für die zweite Östradiol-Versuchsreihe wurden Tiere der Auswahl B ("Zuchtfutter grün") herangezogen (Durchschnittsgewicht 230 g, nicht kastriert). Injiziert wurden ebenfalls 100 mcg Östradiol-Benzoeat; Versuchsende nach 1, 2 und 3 Stunden.

Das Ergebnis ist in der Tabelle 5 Seite 30 enthalten. Die Kontrollwerte liegen bei diesen Tieren etwas höher. Die Hemmung der Fermentaktivität ist nach 3 Stunden signifikant ($p = < 0,1\%$). Der Verlauf der Fermenthemmung ist zusätzlich in der Abb. 7 (Seite 32) graphisch dargestellt. Das Uterusgewicht ist nach dieser Zeit leicht erhöht.

In diesem Versuch wurden außerdem die Aktivitäten der Butyryl-Dehydrogenase in Herzmuskel, Leber und Niere verfolgt. In der Versuchszeit von 3 Stunden wurde in diesen Organen keine Änderung der Fermentaktivität gefunden, so daß wir auf eine Wiedergabe dieser Meßergebnisse verzichten können.

In einer dritten Versuchsreihe wurde die Hormonmenge reduziert, da 100 mcg/Tier als eine außerordentlich große Östradiolmenge anzusehen ist. Wir verwendeten wieder normale Tiere der Auswahl B ("Zuchtfutter grün"), die in diesem Fall mit 1 mcg/Tier behandelt wurden. Die Tötung erfolgte nach 4, 6 und 8 Stunden.

Die Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe konnten im wesentlichen auch mit dieser geringen Hormonmenge reproduziert werden (Tab. 6 Seite 31), wenn auch die Streubreite erheblich größer ist. Das Maximum der Hemmung wurde nach einer Einwirkungszeit von 6 Stunden beobachtet; später steigt die Fermentaktivität weit über die Kontrollwerte an, was auf einer Neusynthese von Enzymmaterial beruhen dürfte. Die starke Streuung wird wohl darauf zurückzuführen sein, daß manche Tiere bereits 4 Stunden nach der Hormongabe eine maximale Hemmung und dann nach 6 Stunden schon wieder einen erheblichen Anstieg der Fermentaktivität aufweisen, während andere Tiere erst nach 6 Stunden den Bereich der minimalen Aktivität erreichen.

Um die Eigenproduktion der Versuchstiere an östrogenen Hormonen auszuschalten, wurden in der folgenden Versuchsreihe kastrierte Weibchen der Auswahl B verwendet. Die Tiere wogen durchschnittlich 300 g, waren 1 Jahr vor Beginn des Versuches kastriert worden und erhielten 0,5 mcg Östradiol-Benzozat / 100 g KG¹⁾ s.c. injiziert. Die Messung der Butyryl-Dehydrogenase-Aktivität wurde 4 Stunden nach der Hormongabe vorgenommen.

1) KG = Körpergewicht

TABELLE 4: Die Wirkung des Östradiol-Benzoeats auf die Aktivität der Butyryldehydrogenase im Uterus (Tiere der Auswahl A ("Altromin"), nicht kastriert, Angabe der Aktivität in n Mol TTC reduziert / mg Protein / Stunde)

Behandlung	Gewicht d. Tiere g	Uterus- Gewicht mg	Uterus- Gewicht mg/100 g KG	Aktivität der Butyryl-Dehydro- genase in n Mol TTC	Datum
Kontroll- Tiere	200	450	225	6,2	6. 3.
	250	400	160	9,4	7. 3.
	230	300	130	8,4	7. 3.
	220	320	145	12,5	8. 3.
	210	310	148	12,6	8. 3.
	210	675	320	13,2	22. 3.
	210	510	243	14,5	22. 3.
	220	350	160	14,8	22. 3.
	Ø 219	Ø 414	Ø 191	Ø = 11,5 ± 3,1	
100 mcg Östradiol- Benzoat, Tötung nach 3 Std.	180	335	186	27,8	3. 4.
	210	505	240	15,4	3. 4.
	210	560	266	59,3	3. 4.
	220	830	377	37,2	3. 4.
	220	800	363	20,0	4. 4.
	220	790	360	20,4	4. 4.
	210	975	464	36,3	4. 4.
	Ø 210	Ø 685	Ø 322	Ø = 29,5 ± 11,8	

TABELLE 5: Die Wirkung des Östradiol-Benzoats auf die Aktivität der Butyryldehydrogenase im Uterus (Tiere der Auswahl B ("Zuchtfutter grün"), nicht kastriert, Angabe der Aktivität der Butyryldehydrogenase in n Mol TTC reduziert / mg Protein / Stunde)

Behandlung	Gewicht d. Tiere g	Uterus- Gewicht mg	Uterus- Gewicht mg/100 g KG	Aktivität der Butyryl-Dehydro- genase in n Mol TTC	Datum
Kontroll- Tiere	220	400	182	12,5	27.2.
	230	420	182	10,8	28.2.
	250	510	204	14,1	28.2.
	240	430	179	12,9	28.2.
	150	335	223	17,7	22.3.
	150	330	220	17,5	23.3.
	170	420	247	14,5	23.3.
	Ø 201	Ø 406	Ø 207	Ø = 14,3 ± 2,6	
100 mcg Östradiol- Benzoat, Tötung nach Std.					
1	210	350	166	9,6	2.3.
1	220	330	150	11,8	2.3.
				Ø = 10,7	
2	290	430	148	8,0	2.3.
2	260	485	186	17,8	3.3.
2	220	420	190	14,5	3.3.
				Ø = 13,4	
3	220	425	193	3,6	3.3.
3	210	340	162	4,9	3.3.
3	250	470	188	3,7	6.3.
3	200	475	237	2,7	6.3.
3	290	585	201	4,2	7.3.
	Ø 234	Ø 459	Ø 196	Ø = 3,8 ± 0,8	

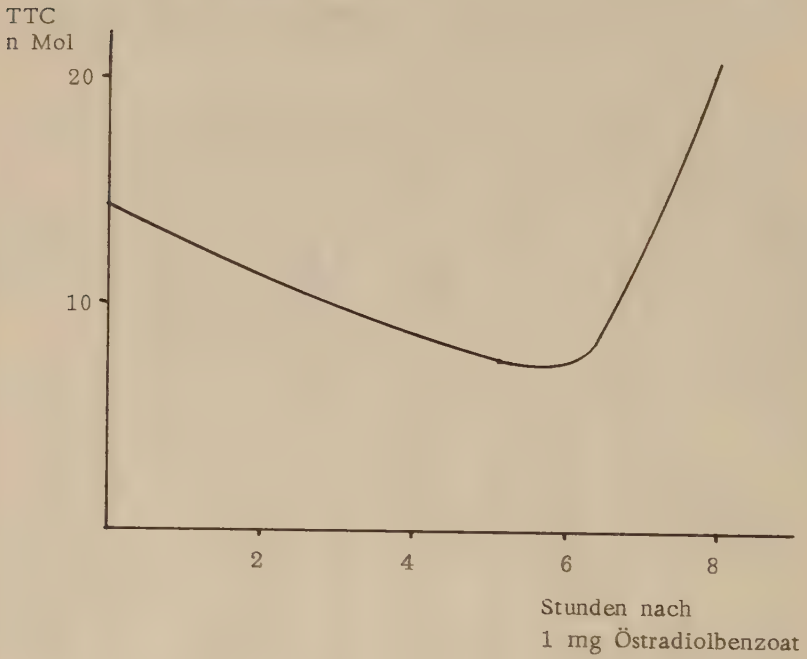
TABELLE 6: Die Aktivität der Butyryldehydrogenase im Uterus nach s.c. Injektion von 1 mcg Östradiol-Benzoat

(Tiere der Auswahl B ("Zuchtfutter grün"), nicht kastriert, Angabe der Aktivität der Butyryldehydrogenase in n Mol TTC reduziert / mg Protein / Stunde)

Der Mittelwert der Kontrolltiere hierzu beträgt $14,3 \pm 2,6$ n Mol TTC (s. Tab. 5 Seite 30).

100 mcg Östradiol-Benzoat, Tötung nach Stunden	Gewicht d. Tiere g	Uterus-Gewicht mg	Uterus-Gewicht mg/100 g KG	Aktivität der Butyryl-Dehydrogenase im Uterus n Mol TTC	Datum
4	170	460	270	u. d. N.	24. 3.
4	140	480	343	11,1	25. 3.
4	150	470	313	18,5	25. 3.
4	130	320	246	13,6	27. 3.
4	125	205	164	11,0	28. 3.
4	115	270	235	15,8	28. 3.
4	170	280	165	u. d. N.	15. 3.
4	180	320	178	u. d. N.	15. 3.
	$\emptyset$ <u>148</u>	$\emptyset$ <u>351</u>	$\emptyset$ <u>239</u>	$\emptyset = 8,8 \pm 7,6$	
6	180	490	272	2,3	24. 3.
6	170	350	206	5,7	24. 3.
6	145	470	324	10,3	25. 3.
6	150	430	286	5,8	25. 3.
6	180	530	294	9,85	28. 3.
6	105	215	205	11,4	28. 3.
	$\emptyset$ <u>155</u>	$\emptyset$ <u>414</u>	$\emptyset$ <u>265</u>	$\emptyset = 7,6 \pm 3,5$	
8	150	750	500	20,8	21. 4.
8	170	390	230	18,9	21. 4.
8	110	550	500	16,3	21. 4.
8	130	490	377	30,0	21. 4.
	$\emptyset$ <u>140</u>	$\emptyset$ <u>545</u>	$\emptyset$ <u>402</u>	$\emptyset = 21,5 \pm 6,2$	

Abb. 7: Aktivität der Butyryldehydrogenase im Uterus nichtkastrierter, mit "Zuchtfutter grün" gefütterter Ratten nach Injektion von 1 mcg Östradiol-Benzoeat



Die erhaltenen Meßwerte sind in der Tabelle 7 zusammengestellt. Von besonderem Interesse ist das Ansteigen der Ferment-Aktivität nach Kastration (etwa 5fach bei Tieren der Auswahl B, "Zuchtfutter grün"), während nach der verhältnismäßig kleinen Östradiolgabe der Normalwert innerhalb 4 Stunden wieder erreicht wird.

TABELLE 7: Die Aktivität der Butyryldehydrogenase im Uterus
(Tiere der Auswahl B ("Zuchtfutter grün"), 1 Jahr vor Testbeginn kastriert, Angabe der Aktivität der Butyryldehydrogenase in n Mol TTC reduziert / mg Protein / Stunde)

Behandlung	Gewicht d. Tiere g	Uterus- Gewicht mg	Uterus- Gewicht mg/100 g KG	Aktivität der Butyryl-Dehydro- genase im Uterus n Mol TTC	Datum
Kontroll- Tiere	360	160	47	59,0	22.4.
	300	150	50	79,5	22.4.
	330	145	44	70,5	22.4.
	Ø <u>330</u>	Ø <u>152</u>	Ø <u>47,0</u>	Ø <u>69,7</u>	
0,5 mcg Östradiol- Benzoat / 100 g KG, Tötung nach 4 Stunden					
	270	110	41	9,5	22.4.
	270	140	52	10,0	22.4.
	280	170	60	15,2	22.4.
	Ø <u>273</u>	Ø <u>140</u>	Ø <u>51,0</u>	Ø <u>11,6</u>	

III. Die Wirkung des Vitamins E auf die Aktivität der Butyryldehydrogenase

Untersucht man die Aktivität der Butyryldehydrogenase im Uterus von kastrierten Tieren der Auswahl A ("Altromin", 230 - 270 g KG, 1 Jahr kastriert), so findet man wesentlich tiefere Werte als bei den Tieren der Auswahl B (s.o.). Sie entsprechen mit 14,8 n Mol TTC/mg Protein/Stunde genau den Kontrollwerten nicht kastrierter Tiere.

Es bestand der Verdacht, daß wiederum die fettlöslichen Vitamine, besonders das Vitamin E, für diese Diskrepanz zwischen den unterschiedlich gefütterten Tiergruppen verantwortlich zu machen sind. Der Uterus besteht zum größten Teil aus Muskelgewebe, das bei Mangel an Vitamin E zu Atrophie neigt. Andererseits ist das Vitamin E ebenfalls ein "synthesefördernder" Wirkstoff, dessen Stoffwechselwirkungen denjenigen des Östradiols prinzipiell ähnlich sind.

Es schien daher aussichtsreich zu sein, die Wirkung dieses fettlöslichen Vitamins auf die Butyryl-Dehydrogenase-Aktivität des Muskels näher zu untersuchen. Wir verwendeten Ratten der Auswahl B ("Zuchtfutter grün"), denen täglich 500 mcg d,l- α -Tokopherol in Olivenöl über 10 Tage s.c. verabreicht wurden. Am zehnten Tag wurde in Herzmuskel, Niere und Leber die Fermentaktivität bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 8 Seite 36 zusammengestellt. Es ist ein deutlicher Abfall der Fermentaktivität im Herzmuskel, ein geringerer auch in der Leber festzustellen. Die statistische Überprüfung ergibt allerdings, daß der gefundene Unterschied wegen der erheblichen individuellen Streubreite nicht signifikant ist.

Um ein gesichertes Ergebnis zu erhalten, haben wir in der folgenden Versuchsreihe mit Vitamin-E-Mangeltieren gearbeitet, die uns freundlicherweise von Fräulein Dr. Zentz und Herrn Dr. Niesar zur Verfügung gestellt wurden (vgl. Seite 9). Die Tiere erhielten einmalig 2, 6, 10 oder 50 mg d,l-Tokopherolacetat und wurden 48 Stunden später zur Feststellung der Fermentaktivität getötet. Das Ergebnis ist in der Tabelle 9 Seite 37 und in der Abb. 8 Seite 38 graphisch aufgezeichnet: 6 mg Vitamin E bewirken in der gewählten Versuchszeit im Herzmuskel eine signifikante Hemmung um über 50% ($p = < 0,1\%$), die nach 50 mg 80% erreicht. In der Leber findet man eine signifikante Verminderung der Enzymaktivität erst nach 50 mg Tokopherol, so daß von einer spezifischen Wirkung des Vitamins E auf das Mus-

kelgewebe gesprochen werden kann.

Von besonderem Interesse ist die reproduzierbare Tatsache, daß nach s.c. Gabe von 10 mg des Vitamins keine Hemmung der Butyryl-Dehydrogenase zu beobachten ist. Die Werte streuen außerordentlich stark und liegen teilweise erheblich über den Kontrollwerten, weshalb wir diesen Mittelwert in der graphischen Darstellung nicht aufgeführt haben. Demnach scheint die Hemmung bei dieser Dosis gar nicht bzw. erst verzögert aufzutreten.

Zusätzlich wurde nun, wie bei den Insulinversuchen, die Geschwindigkeit der Cytochrom c-Oxydation gemessen, und bei der Betrachtung der erhaltenen Werte stellte sich heraus, daß die "Schilddrüsenfunktion" durch 2 mg Tokopherol stimuliert und durch 10 mg stark gehemmt wird (Tabelle 10 Seite 37). 6 mg veränderten die Cytochrom c-Oxydation nicht. Demnach scheint auch hier mit sinkendem Thyroxinspiegel - vergleichbar mit den Insulinversuchen - die Butyryl-Dehydrogenase in geringerem Umfang beeinflußt zu werden.

TABELLE 8: Die Wirkung des Vitamins E auf die Aktivität der Butyryl-Dehydrogenase in Leber, Herz und Niere

(Tiere der Auswahl B, "Zuchtfutter grün", Angabe der Aktivität der Butyryldehydrogenase in n Mol TTC reduziert / mg Protein/Stunde)

Behandlung	Gewicht d. Tiere g	Aktivität der Butyryldehydrogenase in			Datum
		Leber	Herz	Niere	
Kontroll- Tiere	250	49,2	67,5	16,0	8.3.
	200	30,0	76,5	24,0	9.3.
	280	34,2	42,5	-	9.3.
	240	41,5	86,0	29,4	10.3.
	250	26,0	21,0	28,6	10.3.
	270	28,2	34,0	41,5	12.3.
	240	33,3	45,6	39,3	12.3.
	$\bar{\varnothing}$ 247	$\bar{\varnothing} = 34,6 \pm 8,1$	$\bar{\varnothing} = 53,3 \pm 21,9$	$\bar{\varnothing} = 29,8 \pm 9,5$	
500 mcg d, l- - Tokopherol s.c., Tötung nach 10 Tg.	270	23,1	23,0	34,0	19.3.
	230	20,4	-	37,6	19.3.
	260	20,5	41,0	31,0	20.3.
	260	16,0	38,9	32,6	20.3.
	270	34,5	52,5	38,0	21.3.
	300	-	16,8	-	21.3.
	$\bar{\varnothing}$ 265	$\bar{\varnothing} = 22,9 \pm 6,9$	$\bar{\varnothing} = 34,5 \pm 14,4$	$\bar{\varnothing} = 34,6 \pm 3,1$	

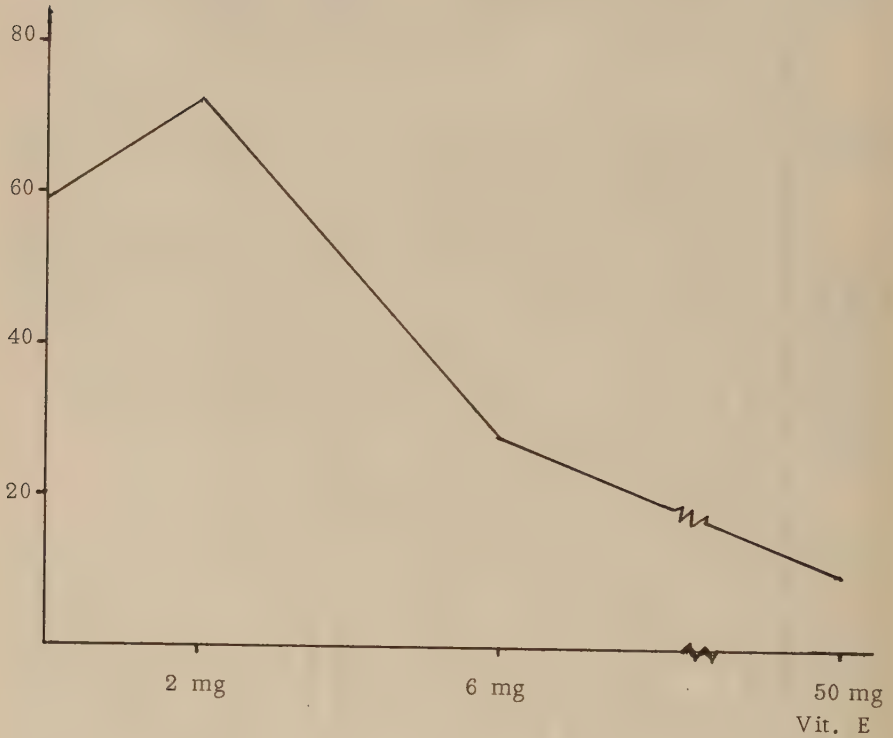
TABELLE 9: Die Wirkung des Vitamins E auf die Aktivität der Butyryl-Dehydrogenase in Herz und Leber von Vitamin-E-Mangeltieren
(Vitamin-E-Mangelratten; Behandlung der Versuchstiere mit dl- α -Tocopherolacetat (TA); Tötung nach 48 Stunden; Angabe der Aktivität der Butyryldehydrogenase in n Mol TTC reduziert/mg Protein/Stunde; Zeit der Durchführung der Versuche: Juni)

E-Mangel		2 mg TA		6 mg TA		10 mg TA		50 mg		TA
Herz	Leber	Herz	Leber	Herz	Leber	Herz	Leber	Herz	Leber	Leber
57,2	50,0	92,0	59,0	21,9	37,0	52,1	28,2	11,7	27,4	
62,5	38,4	52,4	34,1	33,8	25,1	121,0	32,1	7,9	31,7	
59,5	41,7	71,3	50,3	24,2	30,8	81,7	36,8			
60,0	46,3	80,5	45,7	30,0	31,6	58,1	31,2			
55,7	39,6	68,0	41,2	28,7	27,6	70,7	30,9			
		$s_d = \pm 4,4$ $p = 1,4\%$	$s_d = \pm 1,7$ $p = 7,0\%$	$s_d = \pm 1,6$ $p = 60,1\%$	$s_d = \pm 0,2$ $p = 0,3\%$	$s_d = \pm 10,1$ $p = 11,6\%$	$s_d = \pm 3,1$ $p = 2,3\%$	$\phi = 9,8$	$\phi = 29,5$	

TABELLE 10: Aktivität der Cytochrom c-Oxydation in der Leber
(Tiermaterial und Versuchsbedingungen wie Tab. 9; Angabe der Aktivität der Cytochrom c-Oxydation in n Mol Cytochrom c / mg Protein / 120 Sekunden)

E-Mangel		2 mg TA		6 mg TA		10 mg TA		50 mg		TA
147,8		162,9		-		74,0		-		
115,0		208,0		-		67,7		-		
136,3		183,5		-		81,6		-		
133,0		148,8		-		90,1		-		
121,7		153,0		-		77,5		-		
		$s_d = \pm 14,4$ $p = 4,9\%$				$s_d = \pm 6,4$ $p = 0,14\%$				

Abb. 8: Die Aktivität der Butyryldehydrogenase im Herzmuskel von Vitamin-E-Mangelratten nach s.c. Verabreichung von d,l- α -Tocopherolacetat



IV. Versuche über die Wirkung von Vitamin A auf die Butyryl-Dehydrogenase der Hühner-Leber

Das Vitamin A hat nach unseren heutigen Kenntnissen eine dem Vitamin E prinzipiell ähnliche Stoffwechselwirkung. In gewissem Umfang ist es sogar möglich, das eine Vitamin in einer Mangelration durch das andere zu ersetzen, so daß man von einer gegenseitigen Sparwirkung sprechen kann.

Das Vitamin A wirkt selektiv auf die Gewebe, die sich ontogenetisch vom äußeren Keimblatt ableiten (Epidermis, Sinnesepithel, Retina etc.). Es war daher nicht zu erwarten, daß dieses Vitamin in der Leber, in der es im wesentlichen gespeichert wird, eine statistisch zu sichernde Wirkung auf die Butyryl-Dehydrogenase ausübt. Andererseits ist es außerordentlich schwierig, in der Epidermis die Änderung einer Fermentaktivität zu studieren, da man beim Homogenisieren auf erhebliche Schwierigkeiten stößt und da die Fermentaktivitäten gering sind. Noch schwieriger ist es, bei kleinen Versuchstieren (Ratte, Huhn) z. B. Retina-Gewebe in einem Umfang zu erhalten, der die Messung von Flavinzym-Aktivitäten erlaubt. So haben wir uns vorerst darauf beschränkt, die Aktivität der Butyryl-Dehydrogenase in der Leber von Hühnern, die mit einer Vitamin-A-Mangeldiät gefüttert wurden, mit derjenigen zu vergleichen, die in der Leber entsprechender, mit Vitamin A zugefütterter Hühner (10 000 E/kg Fertigfutter) vorgefunden wird.

Insgesamt wurden je 20 Tiere untersucht. Die Geschwindigkeit der Cytochrom c -Oxydation haben wir parallel bei jedem Tier miterfaßt, um evtl. Aussagen darüber machen zu können, inwieweit durch die Vitamin-A-Zulage die Schilddrüsenfunktion verändert wird.

Wie aus der Tabelle 11 Seite 40 zu entnehmen ist, konnte zwar im Mittel eine Abnahme der Butyryl-Dehydrogenase-Aktivität aufgrund der Vitamin-A-Zulage festgestellt werden, die aber wegen der außerordentlich großen individuellen Streuung keineswegs gesichert ist. Dagegen findet man im Paarvergleich eine signifikante Zunahme der Geschwindigkeit der Cytochrom c -Oxydation ($p = 0,32\%$). Verglichen wurden immer die Paare, die an demselben Tag zur Untersuchung kamen. Da die Schilddrüsenfunktion durch verschiedene Faktoren, insbesondere auch durch Schwankungen des Luftdruckes, beeinflußt wird, dürfte dieses Vorgehen gerechtfertigt sein.

TABELLE 11: Die Wirkung des Vitamins A auf die Aktivität der Butyryldehydrogenase und der Cytochrom c-Oxydation in Hühner-Leber

(Tiere der Gruppe 1: Vitamin-A-Mangeldiät

Tiere der Gruppe 2: Zusatz von 10 000 E Vitamin A
pro kg Fertigfutter

Angabe der Aktivität der Butyryldehydrogenase in n Mol TTC reduziert /mg Protein/ Stunde; Angabe der Cytochrom c-Oxydation in n Mol Cyt. c /mg Protein/120 Sekunden)

Datum	Gruppe 1 (Vitamin-A-Mangel)		Gruppe 2 (Vitamin-A-Zusatz)	
	Aktivität d. Butyryl- Dehydrogenase n Mol TTC	Cytochrom c- Oxydation n Mol Cyt. c	Aktivität d. Butyryl- Dehydrogenase n Mol TTC	Cytochrom c- Oxydation n Mol Cyt. c
28.3.	49,8	35,4	13,0	52,5
30.3.	36,0	27,8	38,0	29,3
30.3.	41,2	35,4	45,0	36,0
5.4.	91,0	-	42,3	-
7.4.	83,4	55,4	68,4	92,5
10.4.	75,5	35,8	77,0	53,0
10.4.	31,6	33,6	54,0	34,7
11.4.	60,7	33,6	56,0	90,8
11.4.	76,2	31,6	72,2	71,0
12.4.	32,7	31,3	32,3	42,8
12.4.	46,4	84,5	71,0	90,0
13.4.	53,4	37,5	41,5	42,3
17.4.	70,0	61,5	63,0	55,0
17.4.	41,5	56,0	90,7	113,0
18.4.	112,0	24,0	34,6	36,8
18.4.	59,6	34,3	36,2	36,9
19.4.	46,0	48,0	53,0	46,6
19.4.	33,7	45,6	39,2	46,5
20.4.	69,0	42,8	27,8	52,6
20.4.	31,8	53,6	42,4	66,2
	$\bar{\sigma} = \underline{60,7} \pm 22,8$	$\bar{\sigma} = \underline{42,6}$	$\bar{\sigma} = \underline{49,9} \pm 19,0$	$\bar{\sigma} = \underline{58,0}$
				$s_d = \pm 4,2$
				$p = 0,32\%$

V. Die Beeinflussung der Aktivität der Butyryldehydrogenase in der Leber durch Cortison

In einer letzten Versuchsreihe sollte noch festgestellt werden, ob die Antagonisten des Insulins, ACTH und Cortison, die Aktivität der Butyryl-Dehydrogenase in der Leber verändern. In der unter (1) zitierten Arbeit wurden bereits Untersuchungen angeführt, nach denen Cortison (3 mg/Tier, gemeinsam mit 3 mg SH-Glutathion und 2 mg Ascorbinsäure verabreicht) die Aktivität der DPN-H-Cytochrom c-Reduktase um 100% steigert, so daß man eine ähnliche Wirkung auch für andere Flavinenzyme erwarten konnte.

Wie aus der Tabelle 12 hervorgeht, hat sich diese Erwartung nicht erfüllt. Unter den hier gewählten Versuchsbedingungen konnte keine Aktivitätsänderung der Butyryl-Dehydrogenase nachgewiesen werden.

TABELLE 12: Die Cortisonwirkung auf die Aktivität der Butyryl-Dehydrogenase in der Leber männlicher Ratten
(Tiere der Auswahl A ("Altromin"), Angabe der Aktivität der Butyryldehydrogenase in n Mol TTC reduziert/mg Protein/Stunde)

Behandlung	Tötung nach Std.	Gewicht d. Tiere g	Aktivität der Butyryl- Dehydrogenase n Mol TTC	Datum
12 mg Cortison 6 mg SH-Glutathion 4 mg l-Ascorbinsäure	24	170	27,5	14.3.
	24	180	27,5	14.3.
12 mg Cortison	24	175	25,5	15.3.
	24	180	27,4	15.3.
20 IE ACTH	2	185	25,6	16.3.
	2	170	24,0	16.3.

DISKUSSION

In zahlreichen Versuchsreihen konnte für die typisch "anabolen" (synthesefördernden) Hormone Insulin und Östradiol und für die ebenfalls anabol wirkenden fettlöslichen Vitamine A und E eine organspezifische Änderung der Butyryldehydrogenase-Aktivität nachgewiesen werden. Das Insulin beeinflusst dieses Enzym primär in der Leber und erst sekundär in der Niere. Im Muskel ist unter gleichen Bedingungen keine Änderung der Fermentaktivität durch Insulin festzustellen. Östradiol verändert die Butyryldehydrogenase-Aktivität nur im Uterus. In anderen Organen wurde kein Effekt registriert. Vitamin E hemmt dieses Enzym in erster Linie im Muskel und erst in zweiter Linie in der Leber. Mit Vitamin A war das Ferment in der Leber ebenfalls nicht signifikant zu beeinflussen. In ektodermalen Geweben (Epidermis, Retina), auf die das Vitamin A selektiv wirkt, konnte die Butyryldehydrogenase mit den uns zur Verfügung stehenden Mitteln leider nicht erfaßt werden.

Wir erhalten somit das interessante Ergebnis, daß die untersuchten synthesefördernden Verbindungen die Butyryldehydrogenase immer in den Organen besonders stark beeinflussen, für die sie, wie wir seit längerer Zeit wissen, zur Aufrechterhaltung eines normalen Zellstoffwechsels als essentielle Wirkstoffe benötigt werden. Damit wird es außerordentlich wahrscheinlich, daß zwischen der Änderung der Fermentaktivität und der spezifischen Wirkung der untersuchten Verbindungen ein Zusammenhang besteht. Natürlich darf nicht allein die Beeinflussung der Butyryldehydrogenase für den "anabolen" Effekt verantwortlich gemacht werden, sondern die Änderung einer ganzen Reihe von Flavinenzym-Aktivitäten. Aufgrund einer mehrjährigen Erfahrung, die in diesem Institut gewonnen wurde, läßt sich aussagen, daß bei Normaltieren generell zuerst die Aminosäureoxydase, dann das Flavinenzym der Phosphorylierungskette, dann die DPN-H-Cytochrom c-Reduktion und die Butyryldehydrogenase und schließlich - sehr viel später - erst die Bernsteinsäuredehydrogenase von der Hormonwirkung erfaßt werden (22). Demnach dürfte bei der Aminosäureoxydation und bei der oxydativen Phosphorylierung schon ein Effekt eingetreten sein, wenn wir bei der Dehydrierung des Butyryl-CoA eine Aktivitätsänderung vorfinden.

Dieser Analogieschluß ist hinsichtlich der Vitamin-E- und Insulinwirkung bereits experimentell überprüft worden. Schon 5 Minuten nach s.c. Gabe

von 10 E Insulin, zu einem Zeitpunkt also, zu dem man noch eine normale Butyryldehydrogenase-Aktivität registriert, läßt sich keine meßbare Aminosäureoxydation mehr feststellen (Tiere der Auswahl B). Bei den Tieren der Auswahl A ist unter gleichen Bedingungen in demselben Zeitraum die Kapazität der Phosphorylierungskette bereits um 30% vermindert (22). Bei den Vitamin-E-Mangelratten ist keine l-Aminosäureoxydase-Aktivität in den Herz-sarkosomen nachzuweisen. Auf der anderen Seite findet man hier im Herzmuskel genau das gleiche Stoffwechselbild wie in der Leber thyroxinbehandelter Normaltiere (1): hohe Aktivität der DPN-H-Cytochrom c-Reduktase bei kleiner Phosphorylierungsrate. Durch 2 mg Vitamin E (s.c.) wird die Reduktase innerhalb 48 Stunden auf den Normalwert gesenkt und die Phosphorylierungskapazität zur Norm gesteigert. Die Aktivität der Butyryldehydrogenase hingegen wird bei entsprechenden Mangeltieren durch 2 mg des Vitamins nur geringfügig erhöht (vgl. Abb. 8, Seite 38).

An dieser Stelle muß nochmals daran erinnert werden, daß der Elektronentransport durch die Atmungskette auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen kann: 1. über das phosphorylierende Flavinenzym und 2. über die DPN-H-Cytochrom c-Reduktase. Beide Wege können durch die hier untersuchten Verbindungen gehemmt werden. Generell wird das Flavinenzym mit der größten Redox-Wechselzahl zuerst erfaßt (s.u.), so daß bei hoher Reduktase-Aktivität und niedrigem Phosphorylierungsgrad immer eine Inhibierung der Reduktase unter Verbesserung der Phosphorylierungsausbeute beobachtet wird, während die Hemmung bei hohem P/O-Quotienten primär am phosphorylierenden Flavinenzym einsetzt. Allerdings ist zu bedenken, daß der nicht-phosphorylierende Weg immer bei hohem Elektronendurchgang beschritten wird und dann auch schnell und selektiv gehemmt werden kann, während das phosphorylierende Enzym über die Atmungskontrolle durch das ADP-ATP-System in der Wechselzahl allgemein sehr viel tiefer liegt und dadurch von der Hemmung relativ in viel geringerem Maße erfaßt wird. Die Atmungskontrolle beruht darauf, daß ADP für die Phosphorylierung als essentieller Faktor benötigt wird, wodurch der Elektronenfluß durch das ADP-Angebot kontrolliert wird.

Ein zweiter, nicht minder interessanter Befund ist die Abhängigkeit der Fermenthemmung von der Schilddrüsenfunktion. Durch das Thyroxin wird die Oxydationsleistung der Atmungskette offensichtlich erhöht, was einer Intensivierung der Butyrat-Dehydrierung gleichkommt. Somit scheint die Wirksamkeit des anabolen Faktors von der Wechselzahl des Enzyms abhän-

gig zu sein: Je schneller der Redox-Prozeß läuft, umso stärker und schneller wird die Ferment-Aktivität verändert (Abb. 6, Seite 23).

Dieses Phänomen erinnert an die Wirkungsweise des Chlortetracyclins (CTC), zu deren Aufklärung in diesem Institut zahlreiche Versuche durchgeführt wurden (22). Ausgangspunkt dieser Untersuchungen war die seit einiger Zeit bekannte Tatsache, daß die CTC-Wirkung nur stoffwechselaktive Mikroben erfaßt. Der Minimalstoffwechsel, den man bei ruhenden Zellen vorfindet, bleibt unbeeinflußt. Das gleiche Prinzip scheint für die höher organisierte Zelle zuzutreffen. Nach Beobachtungen, die schon vor einigen Jahren in diesem Institut gemacht wurden, hemmen CTC-Spuren in vitro den Citrat-Abbau durch Lebermitochondrien, und zwar verläuft das Absinken des Citratumsatzes mit der Hemmung der Bernsteinsäure-Dehydrogenase-Aktivität parallel. Andererseits wird die Geschwindigkeit der Bernsteinsäure-Dehydrierung durch das CTC nur dann vermindert, wenn die Mitochondrien Citrat oxydieren, also anscheinend nur dann, wenn die Bernsteinsäure-Dehydrogenase Substrat umsetzt.

Zur Erweiterung dieser Befunde wurde versucht, den beobachteten Aureomycin-Effekt am isolierten Flavin-Enzym zu demonstrieren. Verwendet wurde die verhältnismäßig leicht in hochgereinigter Form zu erhaltene d-Aminosäureoxydase (Co-Ferment Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)). Dieses Enzym hat wie alle anderen hier zur Diskussion stehenden Enzyme freie SH-Gruppen im Apo-Ferment, die für die Wirksamkeit des Fermentes notwendig sind.

Unter Verwendung dieses Modell-Enzyms ließ sich zeigen, daß eine Inhibierung der Fermentreaktion durch CTC immer nur dann eintritt, wenn die prosthetische Flavinkomponente in halb-oxydiertem bzw. halb-reduziertem Zustand vorliegt. Durch Titration der Apo-Ferment-SH-Gruppen konnte außerdem nachgewiesen werden, daß die Enzymhemmung mit dem Verschwinden freier SH-Gruppen in engem Zusammenhang steht. In dem halb-reduzierten Red-Ox-Status findet man bei Flavoproteiden durch Vermessung der Elektronen-paramagnetischen Resonanz (EPR) ein Radikal-Maximum (maximale Semichinonbildung). Das Ausmaß der Fermenthemmung ist demnach der Anzahl Radikal-Elektronen am Flavin-Co-Ferment proportional. Zusätzlich wurde in einem übersichtlichen System die Reaktion zwischen FAD und dem CTC studiert. Auch in diesem Versuch konnte nachgewiesen werden, daß das CTC nur mit dem Semichinon-Radikal des Flavins in

Reaktion tritt. Als Reaktionsprodukt des CTC konnte Iso-Chlortetracyclin identifiziert werden (22).

Aus diesen Befunden läßt sich ableiten, daß die Hydroxylgruppe am C-Atom 4 des CTC-Moleküls durch das Flavin-Radikal oxydiert wird. Das dabei entstehende CTC-Radikal reagiert augenblicklich mit der nächsten SH-Gruppe, wodurch unter Rückbildung von CTC ein Schwefel-Radikal entsteht, das sich nur dadurch absättigen kann, daß es mit einem anderen Schwefel-Radikal eine Disulfid-Brücke bildet. Ist keine SH-Gruppe erreichbar, wird das CTC zu Iso-CTC weiteroxydiert. Es handelt sich also bei der Enzym-Inhibierung um eine echte CTC-Katalyse; die außerordentlich großen Effekte, die durch Spuren dieses Antibiotikums hervorgerufen werden, sind auch nur durch eine Katalyse zu erklären.

Bei den hier zu diskutierenden Hormon-Wirkungen treten nun verschiedene Parallelen auf:

1. Es werden spezifisch Flavinenzyme gehemmt.
2. Der Hemmeffekt ist thyroxin-, also stoffwechselabhängig. Bei kleiner Geschwindigkeit der Cytochrom c-Oxydation liegen die Flavinenzyme weitgehend reduziert vor, was einer geringen Radikal-Konzentration gleichkommt. Durch Beschleunigung dieses Schrittes der Atmungskette wird der Redox-Status der Flavinenzyme zunehmend in Richtung Oxydation verschoben, was mit einer Vermehrung der Semichinonform verbunden ist.
3. Es lassen sich auch hier mit außerordentlich kleinen Substanzmengen sehr große Wirkungen erzielen, was nur durch eine Katalyse zu erklären ist.
4. Schließlich ist noch anzuführen, daß alle hier untersuchten Verbindungen wie das CTC eine leicht oxydierbare OH-Gruppe im Molekül enthalten, von der wir wissen, daß sie für die spezifische Wirkung dieser Stoffe benötigt wird.

Demnach dürfte die Wahrscheinlichkeit außerordentlich groß sein, daß die prinzipielle Wirkungsweise dieser Substanzen am Flavinenzym mit derjenigen des CTC direkt zu vergleichen ist.

Hinsichtlich des Insulins sei noch vermerkt, daß schon vor vielen Jahren von Freudenberg und Mitarbeitern (24) die Bedeutung des Tyrosins für

die Funktionstüchtigkeit des Insulinmoleküls herausgestellt wurde. Das Hormon wird durch Acetylierung und auch durch Jodierung inaktiviert, was im wesentlichen auf einer Reaktion des Tyrosins beruhen dürfte. Auch nach Bestrahlung mit UV-Licht beobachtet man eine typische Änderung des Absorptionsspektrums, die auf eine Veränderung des Tyrosins (und Cystins) hindeutet und mit der Aktivitätsabnahme des Hormones parallel verläuft. Die Bedeutung des aromatischen Hydroxyls für die Reaktion des Insulins mit dem gelben Ferment wird durch das oben diskutierte Wirkungsprinzip verständlich.

ZUSAMMENFASSUNG

In mehreren Versuchsreihen wurde die Wirkung von Insulin, Östradiol und den fettlöslichen Vitaminen A und E auf die Butyryl-Dehydrogenase-Aktivität verschiedener Organe untersucht. Um ein angenähertes Maß für die Schilddrüsenfunktion zu erhalten, wurde parallel dazu die Geschwindigkeit der Cytochrom c-Oxydation bestimmt (vgl. Seite 12). Die erhaltenen Ergebnisse lassen sich etwa folgendermaßen zusammenfassen:

1. Die Butyryldehydrogenase wird durch alle vier Verbindungen organspezifisch gehemmt. Der Hemmung geht allgemein eine Stimulierung voraus.

Insulin vermindert die Fermentaktivität spezifisch in der Leber, Östradiol im Uterus und Vitamin E im Herzmuskel. Den ersten Insulineffekt beobachtet man unter den hier gewählten Bedingungen 20 Minuten nach der Hormongabe (10 E s.c.), während die Aktivität innerhalb 60 Minuten bis an die Grenze der Nachweisbarkeit absinkt.

Die Östradiolwirkung ist 1 Stunde nach s.c. Injektion von 100 mcg pro Tier bei normalen Weibchen deutlich nachweisbar und erreicht nach 3 Stunden ein Maximum. Dieser Effekt ist auch zu beobachten, wenn nur 1 mcg pro Tier verabreicht wird (maximale Hemmung nach 6 Stunden). Bei kastrierten Tieren bewirken 0,5 mcg pro 100 g KG innerhalb 4 Stunden eine starke Hemmung der Ferment-Aktivität.

Vitamin E hemmt die Butyryldehydrogenase im Muskel nach s.c. Gabe von 6 mg des Vitamins in 48 Stunden signifikant. In der Leber konnte die Hemmung erst nach Zuführung von 50 mg Vitamin E statistisch gesichert werden.

Vitamin A (10 000 E/kg Fertigfutter) hemmt die Fermentaktivität der Leber, verglichen mit einer entsprechenden Vitamin-A-Mangelgruppe, nicht signifikant (Hühner-Versuche).

2. Die Geschwindigkeit der Cytochrom c-Oxydation wird durch die Hormone nicht verändert. Beide fettlöslichen Vitamine steigern die Geschwindigkeit: Vitamin A bei A-Mangel-Hünern, wenn dem Futter 10 000 E des Vitamins pro kg Fertigfutter zugelegt werden, Vitamin E nach 2 mg/Tier in 48 Stunden. 10 mg dieses Vitamins bewirken in

demselben Zeitraum eine starke Verlangsamung der Cytochrom c - Oxydation.

3. Durch parallele Bestimmung der Fermentaktivität und der Geschwindigkeit der Cytochrom c -Oxydation wurde gefunden, daß das Ausmaß der Fermenthemmung der Cytochrom c -Oxydation direkt proportional ist. Die Bedeutung dieses Befundes wird gemeinsam mit der möglichen Wirkungsweise der untersuchten Verbindungen am gelben Ferment diskutiert.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Schole, J.: Hoppe Seyler's Ztschr. f. physiol. Chemie 323, 1 (1961)
- (2) Knoop, F.: Oxydationen im Tierkörper, F. Enke Verlag, Stuttgart 1931.
Ders. Beitr. Chem. Phys. Pathol. 6, 150 (1904).
- (3) Magnus-Levy, A.: John Hopkins Bull. 22, 50 (1911).
- (4) Lynen, F.: Zeitschr. f. angew. Chemie 67, 463 (1955).
- (5) Seubert, W., Greull, G., Lynen, F.: Zeitschr. f. angew. Chemie 69, 359 (1957).
- (6) Crane, F.L., Hauge, J.G., Beinert, H.: Biochim. Biophys. Acta 17, 293 (1955).
- (7) Seubert, W., Lynen, F.: Journ. of Americ. Chem. Soc. 75, 2787 (1953).
- (8) Green, D.E., Mii, S., Mahler, H.R., Bock, R.M.: Journal of Biol. Chem. 206, 1 (1954).
- (9) Seubert, W.: Diss. München 1956.
- (10) Mahler, H.R.: J. Biol. Chem. 206, 13 (1954).
- (11) Crane, F.L., Beinert, H.: J. of Americ. Chem. Soc. 76, 4491 (1954).
- (12) Diess.: J. Biol. Chem. 218, 717 (1956).
- (13) Carter und Phizackerley: Bioch. Journal 49, 227 (1951).
- (14) Tulpule, P.G., Patwardhan, N.V.: Bericht an Indian Council of med. Research Neu Delhi, 1950.
- (15) Diess.: Arch. Bioch. Biophys. 39, 450 - 456 (Aug. 1952).
- (16) Black, Mauris M., Speer, Francis D.: Arch. of Pathol. 59, 691 - 694 (1955 N.Y.).
- (17) Friedmann: J. of Nutrition 65, 143 ff (1958).

- (18) Rindani: Am. J. of Physiology 193, 73 (1958).
- (19) Kuhn, R., Jerchel, D.: Naturforschung und Medizin in Deutschland 1947, Biochemie I, 59.
- (20) Mahler, Henry R.: Kaplan, Methods in Enzymology, Vol I und J. Biol. Chem. 206, 13 (1954).
- (21) Schole, J.: Hoppe Seyler's Ztschr. f. physiol. Chemie 317, 281 (1959).
- (22) Schole, J.: Unveröffentlicht
- (23) Krah1, M.E.: The Action of Insulin on Cells
Academic Press 1961.
- (24) Freudenberg, Dirscherl und Eyer: Hoppe Seyler's Ztschr. f. physiol. Chem. 187, 89 (1930).

Herrn Professor Dr. Dr. Brüggemann danke
ich besonders für die Überlassung des Themas
und die Förderung der Arbeit.

Herrn Dr. Schole bin ich für jederzeit ge-
währte Diskussionen ebenfalls zu Dank verpflich-
tet.

LEBENS LAUF

Ich wurde am 16. Oktober 1938 als erstes Kind der Eheleute Adam Wolf und Liesel Wolf, geb. Schumacher, in Freiburg im Breisgau geboren.

Nach Beendigung der 5. Klasse der Volksschulen in Hornberg und Lauda besuchte ich das humanistische Gymnasium in Tauberbischofsheim und später das Kurfürst-Friedrich-Gymnasium in Heidelberg. Die Reifeprüfung legte ich am Realgymnasium Mosbach im Frühjahr 1958 ab.

Im Sommersemester 1958 begann ich das Studium der Veterinärmedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München, wo ich im März 1963 die tierärztliche Staatsprüfung ablegte. Meine Praktikantenzeit absolvierte ich an der Medizinischen Klinik der Tierärztlichen Fakultät der Universität München, Vorstand Prof. Dr. K. Ullrich, sowie bei Lehtierarzt Herrn Dr. Fritz Eichin in Weil am Rhein.

Zur Zeit arbeite ich als Assistent in der Großtierpraxis bei Herrn Dr. Theo Rieger in Emmendingen.

